

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**OLAIR CARLOS BELTRAME**

**PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DAS  
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DE HEMOGLOBINA GLICADA E  
FRUTOSAMINA EM CÃES SADIOS, DIABÉTICOS E SOB INSULINOTERAPIA**

**CURITIBA**

**2011**

**OLAIR CALOS BELTRAME**

**PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DAS  
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DE HEMOGLOBINA GLICADA E  
FRUTOSAMINA EM CÃES SADIOS, DIABÉTICOS E SOB INSULINOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosangela Locatelli Dittrich

Comitê de Orientação: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Fabiano Montiani Ferreira

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Ricardo G. D' O.C. Vilani

**CURITIBA**

**2011**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS

PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DA HEMOGLOBINA GLICADA E FRUTOSAMINA EM CÃES SADIOS, DIABÉTICOS E SOB INSULINOTERAPIA”** apresentada pelo Mestrando OLAIR CARLOS BELTRAME declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato .....APTO..... para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 31 de março de 2011

Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich  
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Membro

Professor Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani

Membro

## AGRADECIMENTOS

A Marta, por estar sempre do meu lado, por não perder a paciência nos momentos de mau humor, por não reclamar e entender nos momentos em que eu estive ausente.

As minhas filhas Gabrielle e Bruna, principalmente a Bruna que mesmo sem saber do que se tratava queria ficar comigo até tarde da noite para ajudar a escrever.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por estarem sempre me apoiando e torcendo por mim mesmo estando longe, mas dando incentivo.

Agradeço a minha orientadora professora Rosangela Locatelli Dittrich pela orientação, que além de minha orientadora foi a grande incentivadora a realização deste mestrado, pelos ensinamentos, por toda a ajuda e confiança em mim depositada.

Aos funcionários, estagiários, monitores, residentes e bolsistas do laboratório de Patologia Clínica Veterinária pela ajuda na separação das amostras. Em especial a Nina e à Kemy.

Agradeço a Lia por estar sempre disposta a ajudar nas traduções e formatação da dissertação, mesmo estando em cima da hora, nunca disse não.

Aos professores Fabiano Montiani Ferreira e Ricardo G. D' O.C. Vilani pelas orientações e por fazerem parte do comitê de orientação.

Aos residentes da clínica cirúrgica de pequenos animais do HV-UFPR pelo auxílio e coletas das amostras em especial ao Leandro.

## RESUMO

Diabetes mellitus é uma das endocrinopatias mais comuns na clínica de pequenos animais, caracterizada por distúrbio no pâncreas endócrino com diminuição nos níveis de insulina. Esta deficiência ou ausência de insulina pode ser parcial ou absoluta, e pode resultar em alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. O diagnóstico é realizado pela dosagem da glicose sanguínea, que está elevada em animais portadores da doença. Nos casos duvidosos deve-se realizar o teste de tolerância a glicose. Os principais sinais da doença são poliúria, polidipsia, polifagia e glicosúria. Dependendo do tipo de diabetes, o tratamento envolve o uso de fármacos, controle alimentar e atividade física. O tratamento da doença deve ser monitorado com dosagens da glicose e principalmente da hemoglobina glicada e frutossamina. Em seres humanos a hemoglobina glicada e frutossamina são considerados exames padrão ouro, com valores de referência estabelecidos com metodologias padronizadas. Na medicina veterinária as metodologias para a determinação da hemoglobina glicada e frutossamina ainda não são utilizadas na rotina e não foram extrapoladas da bioquímica clínica humana. Os valores de referência de hemoglobina glicada e frutossamina para animais saudáveis e para animais diabéticos são escassos e até o presente, não foram determinadas com metodologia padronizada. O presente estudo está dividido em III capítulos. O capítulo I contém uma revisão de literatura sobre Diabetes mellitus, com etiologia, fisiopatologia, classificação, diagnóstico, tratamento, monitoramento e descrição da metodologia para determinação da hemoglobina glicada e frutossamina. Nos capítulos II e III estão descritos os experimentos relacionados com a padronização e determinação dos valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina. O capítulo II aborda o tema “Determinação dos valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina em cães” e o capítulo III o tema “Determinação da hemoglobina glicada e frutossamina em cães diabéticos sob insulino-terapia”.

**PALAVRAS-CHAVE:** cães, hemoglobina glicada, frutossamina, diabetes mellitus.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the most common endocrinopathies in small animals, characterized by an alteration in the endocrine pancreas with a decrease in the insulin levels. This insulin deficiency or absence may be partial or absolute and may lead to alterations in the carbohydrates, lipids and protein. The diagnosis is made by measuring the blood insulin levels, which is high in animals with the disease. In dubious cases a glucose tolerance test must be performed. The main signs of the disease are polyuria, polydipsia, polyphagia and glycosuria. According to the diabetes type, treatment includes use of drugs, diet and exercises. The development of the disease should be monitored during the treatment by measuring the glucose levels and specially the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels. In humans, the measurement of the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels is considered the golden standard test and the reference values established with standardized methodology. In veterinary medicine the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels are not commonly used and the methodologies were not adapted from the human clinical biochemistry. The reference values for hemoglobin glycosylated and fructosamine for healthy and diabetic animals are scarce and until now were not established with a standardized methodology. This study is divided in three chapters. The first one is a literature review on Diabetes mellitus, including its etiology, physiopathology, classification, diagnosis, treatment, monitoring and description of the methodology for evaluation of the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels. In chapters two and three the standardization and determination experiments for establishing reference values for the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels are specified. The second chapter discusses the topic "Determination of the reference values for hemoglobin glycosylated and fructosamine in dogs" and the third chapter the topic "Determination of hemoglobin glycosylated and fructosamine in diabetic dogs treated with insulin".

**KEY WORDS:** dogs, hemoglobin glycosylated, fructosamine, diabetes mellitus.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E INTERVALOS MÍNIMO E MÁXIMO DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DA HEMOGLOBINA GLICADA, FRUTOSAMINA E GLICOSE EM CÃES SADIOS, MACHOS E FÊMEAS.....	42
---	----

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 – PARÂMETROS DE GLICOSE, HEMOGLOBINA GLICADA E FRUTOSAMINA (VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO) DE CÃES DIABÉTICOS .....	53
TABELA 2 – VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E INTERVALOS MÍNIMO E MÁXIMO DA HEMOGLOBINA GLICADA, FRUTOSAMINA E GLICOSE EM CÃES DIABÉTICOS. ....	54
TABELA 3 – VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO E OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DOS PACIENTES DIABÉTICOS SOB INSULINOTERAPIA.....	55

## LISTA DE SIGLAS

A1C - Hemoglobina glicada  
AGEs - produtos finais da glicação  
ADA – Associação Americana de Diabetes  
ALT – alamina aminotransferase  
AST – aspatato aminotransferase  
CAD – cetoacidose metabólica  
CHGM – concentração da hemoglobina globular média  
DGKC – Associação de Química Clínica da Alemanha  
DM – diabetes mellitus  
DM2 – diabetes mellitus tipo 2  
DMID – diabetes mellitus insulino dependente  
DMDI – diabetes mellitus dependente de insulina  
DMNID – diabetes mellitus não insulino dependente  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
GLDH – glutamato dehydrogenase  
GTT – teste de tolerância a glicose  
HbA – hemoglobina A  
HbA1 – hemoglobina A1  
HbA1a1 – hemoglobina A1 a1  
HbA1a2 – hemoglobina A1 a2  
HbA1b – hemoglobina A1b  
HbA1c – hemoglobina A1c  
HbAO – hemoglobina AO  
Kg – quilograma  
Kcal/Kg – quilocaloria por quilograma  
mg/dL – miligramas por decilitro  
NBT – azul de nitrotetrazólio  
nm – nanômetro  
SRD – sem raça definida  
TOTG – teste oral de tolerância a glicose  
UFPR – Universidade Federal do Paraná  
U/Kg – unidade por quilograma  
UV – ultravioleta  
VGM – volume globular médio



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
2.1. OBJETIVO GERAL .....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
CAPÍTULO I – DIABETES MELLITUS- REVISÃO .....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
3.1. ETIOLOGIA .....	15
3.1.1 DESTRUIÇÃO DAS CÉLULAS BETA DO PÂNCREAS .....	16
3.1.2 PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA .....	16
3.1.3 OBESIDADE .....	16
3.1.4 HORMÔNIOS DIABETOGENICOS.....	17
3.1.5 ESTRO E PRENHEZ.....	17
3.1.6 IDADE .....	18
3.2 FISIOPATOLOGIA .....	18
3.3 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS EM CÃES .....	19
3.3.1 TIPO I .....	20
3.3.2 TIPO II .....	20
3.3.3 OUTROS TIPOS .....	21
3.4 DIAGNÓSTICO .....	22
3.5 TRATAMENTO .....	24
3.6 MONITORAMENTO .....	25
3.6.1 HEMOGLOBINA GLICADA .....	25
3.6.1.1 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA .....	27
3.6.2 FRUTOSAMINA .....	28
3.6.2.1 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA FRUTOSAMINA ....	29
9. REFERÊNCIAS .....	30

CAPÍTULO II – VALORES DE REFERÊNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DA HEMOGLOBINA GLICADA E FRUTOSAMINA EM CÃES.....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	37
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.1 HEMOGRAMA .....	40
2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	41
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
4. RESULTADOS .....	42
5. DISCUSSÃO .....	43
6. CONCLUSÃO.....	44
7. AGRADECIMENTOS .....	45
8. REFERÊNCIAS .....	46
CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DA HEMOGLOBINA GLICADA E FRUTOSAMINA EM CÃES DIABÉTICOS SOB INSULINOTERAPIA .....	48
RESUMO .....	48
ABSTRACT .....	49
1. INTRODUÇÃO .....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	52
2.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	52
3. RESULTADOS .....	53
4. DISCUSSÃO .....	56
5. CONCLUSÕES .....	59
6. REFERÊNCIAS .....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
ANEXO .....	63

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Diabetes mellitus é uma doença endócrina frequentemente diagnosticado na clínica veterinária (LEROY, 1999; FARIA, 2007). O diabetes mellitus pertence ao grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante da deficiência absoluta ou relativa de insulina, em decorrência da incapacidade das ilhotas pancreáticas em secretar insulina e ou da ação deficiente da insulina nos tecidos. Os fatores que contribuem para a hiperglicemia podem ser resultantes da diminuição da secreção e utilização de insulina, e produção aumentada de glicose (NELSON, 2004; POWERS, 2005; FARIA, 2007).

As alterações metabólicas associadas ao diabetes mellitus têm consequências em múltiplos órgãos e sistemas, e estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade (NELSON, 2004; POWERS, 2005).

Entre as causas do diabetes mellitus nos animais de estimação estão relacionados fatores como: pancreatite; organismo debilitado; hereditariedade; fatores de resistência a insulina, entre eles a obesidade; drogas; infecções (DODSON, 2007).

De acordo com GOLDESTINE (2004), o diabetes mellitus em cães pode ser classificado em tipo I, tipo II e outros tipos de acordo com a manifestação clínica e a capacidade secretora de insulina das células beta do pâncreas.

O diagnóstico do diabetes mellitus deve ser realizado precocemente com a determinação das concentrações sanguíneas de glicose em jejum. Se o diagnóstico é duvidoso somente com a determinação da glicemia, deve-se realizar o teste de sobrecarga de glicose por via oral ou intravenosa (KANEKO et al., 2008).

É importante fazer o diagnóstico precoce e preciso do diabetes mellitus inclusive com a classificação do tipo para a melhor intervenção clínica. Dependendo da classificação, o tratamento pode ser feito pela mudança alimenta, nos hábitos de vida do animal ou aplicações diárias de insulina (APPLETON et al., 2001). O monitoramento do tratamento é de extrema importância e deve ser realizado em períodos determinados de acordo com os resultados dos exames durante o monitoramento. Em seres humanos, a hemoglobina glicada e a frutamina são ferramentas padrão ouro para monitorar o tratamento do diabetes mellitus, pois

fornece informações precisas dos níveis glicêmicos médios a curto e longo prazo (MARCA et al., 2000a).

Os valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina existentes para cães são limitados e com metodologias sem padronização. Nos Estados Unidos, JENSEN e AAES (1992) e ELLIOT et al. (1999), extrapolaram a metodologia utilizada para a determinação de frutossamina de humanos e determinaram valores de referência para cães. No Brasil, até o presente momento, não foram estabelecidos valores de referência da frutossamina para cães saudáveis e para diabéticos.

Em cães, os valores de referência encontrados de hemoglobina glicada foram determinados por WOOD e SMITH (1980) e MAHAFFEY e CORNELIUS (1982) nos Estados Unidos. No Brasil, DE MARCO et al. (1999) determinaram valores de referência, mas com número pequeno de amostras e sem padronização da técnica.

Este trabalho está dividido em duas partes. A primeira parte constitui-se de um capítulo com revisão de literatura sobre diabetes mellitus, sobre os aspectos da doença, diagnóstico com ênfase na determinação das concentrações de hemoglobina glicada e frutossamina, tratamento e monitoramento. A segunda parte está formada por dois artigos científicos na forma de capítulos, que são apresentados de acordo com os resultados obtidos nos experimentos. O capítulo II apresenta o experimento “Valores de referência para as concentrações sanguíneas da hemoglobina glicada e frutossamina em cães saudáveis” e o capítulo III o estudo “Determinação das concentrações sanguíneas da hemoglobina glicada e frutossamina em cães diabéticos sob insulino-terapia”.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar as concentrações sanguíneas da hemoglobina glicada e da frutossamina em cães saudáveis e diabéticos com o emprego de metodologia padronizada.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Determinar os valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina em cães saudáveis;

**2.2.2** Determinar os valores de hemoglobina glicada e frutossamina em cães diabéticos e sob tratamento com insulino-terapia;

**2.2.3** Avaliar o monitoramento do tratamento dos cães diabéticos por meio da hemoglobina glicada e frutossamina;

**2.2.4** Padronizar e estabelecer valores de referência de hemoglobina glicada e frutossamina para cães, utilizando os métodos aprovados pela Sociedade Brasileira de Diabetes.

## CAPÍTULO I

### DIABETES MELLITUS- REVISÃO

#### 3. REVISÃO DE LITERATURA

*Diabetes mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia (*Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007*). É caracterizado pelo excesso de glicose no sangue, provocado pela deficiência de produção e/ou de ação da insulina, causando sintomas agudos e complicações crônicas características, resultando assim, em metabolismo anormal da glicose. Além disso, também ocorrem anormalidades nos metabolismos de proteínas e lipídeos. Os animais com diabetes mellitus geralmente apresentam concentração de glicose sangüínea acima do limiar renal e, portanto, glicosúria. A presença de glicose na urina é menos comum nas outras causas de intolerância a glicose (AKOL et al., 1992).

Para conviver com a doença, há necessidade de um controle rigoroso da glicemia, uma vez que ainda não existe cura (NELSON, et al., 2004).

Cães portadores de diabetes podem ou não ser dependentes de insulina, de acordo com a classificação do tipo de diabetes. O diabetes mellitus insulino dependente (DMID) ou tipo I, é o mais encontrado em cães, também conhecido como dependente de insulina, por ocorrer uma destruição imunomediada das células beta produtoras de insulina no pâncreas. O diabetes mellitus não insulino dependente (DMNID) ou tipo II, pode ser ou não dependente de insulina. Cerca de 50 a 70% dos gatos com diabetes mellitus tipo II são dependentes de insulina (LASSEN, 2007) devido a resistência dos tecidos à insulina ou por prejuízo da função das células beta, e é a forma mais encontrada em gatos (GAVIN, 2000).

No decorrer do tempo, a hiperglicemia prolongada promove o desenvolvimento de lesões extensas e irreversíveis, afetando os olhos, rins, nervos, pequenos e grandes vasos e também a coagulação sanguínea. Os níveis de glicose

sanguínea persistentemente elevados são tóxicos ao organismo, por três mecanismos diferentes: a promoção da glicação de proteínas, a hiperosmolaridade e o aumento dos níveis de sorbitol intracelular. Podem ocorrer complicações como: polineuropatia, perda da visão, insuficiência renal, catarata, doença vascular e até amputação de membros (SACKS, 2008).

Outra complicação grave do DM em cães é a cetoacidose diabética (CAD). É uma emergência médica caracterizada por alterações metabólicas extremas, incluindo hiperglicemia, acidose metabólica, cetonemia, desidratação e perda de eletrólitos. A CAD ocorre quando há uma deficiência de insulina combinada a um excesso de hormônios hiperglicemiantes (catecolaminas, glucagon, cortisol e hormônio do crescimento). A mortalidade decorrente da CAD em cães é de aproximadamente 30 a 40% (KITABCHI et al., 2001).

### **3.1 ETIOLOGIA**

A causa do DM em cães não foi totalmente elucidada, mas sem dúvida, é multifatorial. Os fatores predisponentes ao desenvolvimento do diabetes mellitus em cães são: genéticos, distúrbios imuno-mediados, infecções, doenças, drogas antagonistas a ação da insulina e obesidade (NELSON, 1994).

A maioria dos cães que apresentam qualquer tipo de diabetes tem entre quatro e 14 anos de idade, com pico de prevalência entre sete a nove anos de idade. O diabetes juvenil ocorre em cães com menos de um ano de idade e é raro (AKOL, WADDLE e EILDING, 1992).

A prevalência do DM vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Nos Estados Unidos, estudos apontam que um a cada 152 animais desenvolvem a doença ou algum distúrbio relacionado ao metabolismo da glicose (CATCHPOLE et al., 2005). No Brasil, autores citam que a incidência da doença vem aumentando, mas não existem estudos estatísticos da prevalência da doença.

Os principais fatores predisponentes do desenvolvimento do DM em cães estão escritos a seguir.

### **3.1.1 DESTRUIÇÃO DAS CÉLULAS BETA DO PÂNCREAS**

A destruição das células beta do pâncreas pode ser decorrente de uma pancreatite aguda ou crônica recorrente, administração de drogas citotóxicas, pancreatectomia por infecções virais como parvovirose canina (NELSON & FELDMAN, 1998). Esta situação também pode estar relacionada com a destruição imunomediada, na qual são detectados anticorpos anticélulas das ilhotas (NELSON, 1992 e NGUYEN et al., 1998).

### **3.1.2 PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA**

Existe, provavelmente, uma tendência familiar ao desenvolvimento da doença. Estudos demonstraram que algumas raças caninas como Cocker, Pastor Alemão, Collies, Pequinês e Boxer apresentam pouco risco para desenvolver o DM. Por outro lado, raças como Keeshounds, Golden, Schnauzer, Pinscher, Poodle e SRD, são os que apresentam maior tendência ao diabetes mellitus ou às enfermidades precursoras (NELSON & FELDMANN 1998; NGUYEN et al., 1998 e APPLETON et al., 2005 ).

Alterações genéticas nas células beta podem predispor o animal ao desenvolvimento do diabetes mellitus após exposição a infecções virais, agentes químicos tóxicos, situações de tensão crônica, ou ainda a exposição à antagonistas da insulina (CRISTOPHER e NEILL, 2000).

### **3.1.3 OBESIDADE**

A obesidade é um importante fator predisponente no desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo II, ocorre principalmente em gatos e em humanos, é denominado não insulino dependente (DMNID). A obesidade resulta em um antagonismo periférico à insulina e hiperinsulinemia inicial. Entretanto, as causas do antagonismo à insulina são heterogêneas. A obesidade provoca um estado de resistência ao hormônio devido a secreção prejudicada e ainda um defeito nos receptores da insulina nas células alvo. A lipemia pré-prandial, provavelmente



causada pela hipertrigliceridemia pode também prejudicar a afinidade nos receptores de insulina (FORD et al., 1993).

A obesidade interfere com a homeostasia da glicose e da insulina e o grau de insulinemia está altamente correlacionado com o grau de obesidade em cães diabéticos e não diabéticos. Desta forma, torna-se importante o controle do peso no tratamento do diabetes mellitus em cães (MARMOR et al., 2000).

### **3.1.4 HORMÔNIOS DIABETOGENICOS**

Devido à ação antagonista à insulina, os hormônios diabetogênicos podem levar a exaustão temporária das células beta das ilhotas do pâncreas. Os glicocorticóides, adrenalina, glucagon e o hormônio do crescimento são considerados hormônios diabetogênicos (EIGENMANN et al., 1983). Quando a concentração plasmática de um destes hormônios estiver aumentada devido a secreção excessiva ou administração exógena, há um antagonismo à insulina nos tecidos periféricos e/ ou um favorecimento à gliconeogênese e glicogenólise hepática, hiperinsulinemia e tolerância prejudicada a glicose (NELSON 1994).

### **3.1.5 ESTRO E PRENHEZ**

O estrógeno e a progesterona reduzem a sensibilidade dos órgãos-alvo para a ação da insulina. Assim, as fêmeas não castradas são mais propensas a desenvolverem a doença. Estudos têm demonstrado que os sinais clínicos do diabetes mellitus geralmente são observados durante o estro ou diestro. Ainda, as administrações frequentes de progestágenos sintéticos podem levar a uma influência persistente da progesterona (NELSON & FELDMANN, 1998; FELDMANN, 1989).

### 3.1.6 IDADE

A doença é de importância para a população idosa de cães pela elevada frequência de ocorrência e pelo fato de acarretar complicações cardiovasculares, cerebrovasculares, microvasculares, retinopatia, nefropatia e neuropatia. Essas complicações contribuem para a queda na qualidade de vida dos cães idosos. Não existem dados estatísticos comparando a incidência da doença em relação a idade, mas estudos revelam que em cães com mais de oito anos de idade, o aparecimento do DM é muito mais freqüente do que naqueles com idade inferior a oito anos de idade (COELI et al., 2003).

### 3.2 FISIOPATOLOGIA

A deficiência relativa ou absoluta de insulina resulta numa diminuição da utilização da glicose, aminoácidos e ácidos graxos pelos tecidos periféricos, como fígado, músculos e gordura. Assim a glicose oriunda da dieta ou da gliconeogênese hepática acumula-se na circulação, causando hiperglicemia. Com o aumento da concentração plasmática de glicose, a capacidade das células tubulares renais em reabsorver glicose do filtrado glomerular é excedido, resultando em glicosúria. Isto ocorre quando a concentração plasmática de glicose excede 180 a 220 mg/dL. No cão sadio a concentração normal de glicose plasmática varia entre 65 a 110 mg/dL (BROBST, 1997).

A glicosúria cria uma diurese osmótica, causando poliúria. A polidipsia compensatória impede a desidratação. A glicosúria também representa perda de calorias e, associada à diminuição do metabolismo tecidual periférico da glicose ingerida, resulta na perda de peso, pois a baixa capacidade de utilização periférica da glicose induz a um estado catabólico. A gordura e a proteína do músculo são metabolizadas formando substratos para a gliconeogênese (NELSON, 1992; NELSON, 1994; NGUYEN et al., 1998).

A capacidade da glicose em penetrar na célula está sob influência da insulina. No diabetes mellitus com ausência relativa ou absoluta da insulina, a glicose não penetra nas células (MELLANBY e HERRTAGE, 2002). Quando este mecanismo está desencadeado no animal, os quatro sinais clássicos do diabetes mellitus

também podem ser observados: poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso (KANEKO et al., 1997).

Quando o médico veterinário suspeitar que o animal apresenta os sinais clássicos do DM, deve-se confirmar a doença com exames laboratoriais e identificar o tipo de diabetes.

### **3.3 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS EM CÃES**

O diabetes mellitus em cães, como em humanos, é classificado em três tipos com base na capacidade secretora das células beta do pâncreas: tipo I ou dependente de insulina; tipo II e outros tipos de DM (GOLDESTINE, 2004; CATCHPOLE et al., 2005; STOCKHAM E SCOTT, 2011).

É recomendado que as classificações dependente de insulina e não dependente de insulina sejam descartadas em virtude da confusão gerada por sua utilização. O novo sistema de classificação proposto para DM canino é semelhante às classificações da hiperglicemia patológica e consiste em dois grupos principais:

- 1) DM tipo 1: destruição das células beta do pâncreas, causando deficiência absoluta de insulina. Anteriormente conhecida como DM dependente de insulina, DM tipo I ou DM de início juvenil.
- 2) DM tipo 2: resistência à insulina, com resposta secretora compensatória inadequada. Anteriormente era conhecida como DM não-dependente de insulina ou DM de início adulto (mais comum em gatos).

Nos outros tipos de DM estão incluídas as seguintes condições:

DM pancreático: pancreatite, carcinoma pancreático

DM endócrina (não pancreático): glucagonoma, hiperadrenocorticism, hipotireoidismo, hipertireoidismo).

DM induzido por medicamentos: esteróides (glicocorticóides)

DM infeccioso (sepse, diarreia viral bovina)

DM genético

Hiperamonemia

Anticorpos anti-insulina

### **3.3.1 TIPO I**

Grupo I ou diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) é caracterizado pela destruição das células beta acarretando uma deficiência absoluta do hormônio. Alguns cães têm anticorpos anti-células beta, e apresentam uma alta concentração de glicose sanguínea basal. É o tipo de diabetes mais encontrado em cães (HOENIG & DAWE, 1992).

As células betas do pâncreas não têm capacidade de responder ao aumento da glicemia com a liberação de insulina, sendo semelhante ao diabetes tipo I que ocorre em humanos. É um distúrbio específico envolvendo as células beta do pâncreas, que resulta na redução dos níveis de insulina e ocorre hiperglicemia (NICHOLS, 1992). A taxa de destruição das células é variável, sendo em geral mais rápida entre os jovens. A forma lenta é progressiva e ocorre em geral nos humanos adultos (SOCIEDADE BRASILEIRA de DIABETES, 2007).

De acordo com NELSON (1992), o DMDI foi conceitualmente dividido em seis estágios. O primeiro é a suscetibilidade genética, o segundo está envolvido com a autoimunidade das células beta que pode envolver fatores ambientais, medicamentos e agentes infecciosos. O terceiro estágio é o período da autoimunidade ativa, mas a secreção da insulina é mantida normal. No quarto estágio, as anormalidades imunológicas persistem, mas a secreção de insulina estimulada pela glicose diminui progressivamente. O diabetes desenvolve-se no quinto estágio, embora ainda exista uma secreção residual de insulina, e no último estágio a destruição das células beta é total.

Uma forma transitória ou reversível do DMDI é rara em cães e geralmente é decorrente de uma enfermidade antagônica da insulina. A resolução do antagonismo insulínico pode resultar em resolução do problema caso ainda exista uma população significativa de células beta funcionais (NICHOLS, 1992).

### **3.3.2 TIPO II**

O diabetes mellitus tipo II (DM2) ocorre devido a uma resistência a insulina com resposta secretória compensatória inadequada. É mais comum em gatos e é

causada por defeitos na secreção de insulina e defeitos nos receptores de insulina nas células alvo, os dois principais critérios para o DM2.

A obesidade está associada com aumento da incidência de DM2 em gatos e em humanos. Quando os gatos mudam de “status” magro para obeso, desenvolvem intolerância a glicose e menor expressão do GLUT 4. Alterações nas concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados, leptina e glucagon podem ser fatores contribuintes para o estado diabético felino. Apesar de ocorrerem alterações na tolerância a glicose e secreção de insulina em cães obesos, a obesidade não parece causar DM em cães (HOENING, 2002).

O DM2 é o tipo de diabetes em que há uma alta concentração basal de glicose sanguínea e uma concentração basal de insulina normal ou elevada. Pode ocorrer uma liberação retardada de insulina endógena após estímulo com glicose, e é semelhante ao tipo de diabetes que ocorre em humanos (HURTY e FLATLAND, 2005).

Pacientes portadores deste tipo de diabetes podem ou não serem dependentes de insulina e geralmente apresentam sobrepeso ou obesidade. Diferentemente do DMDI auto-imune não há indicadores específicos para o DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

### **3.3.3 OUTROS TIPOS**

Nesta classificação estão os casos de DM que apresentam uma concentração sanguínea de glicose discretamente elevada e uma concentração basal praticamente normal de insulina. Esses cães são capazes de responder ao teste de tolerância a glicose, semelhante nos seres humanos ao diabetes tipo III, também denominado de outros tipos de diabetes. São incluídos neste grupo o diabetes endocrinamente induzido pela concentração aumentada de qualquer um dos hormônios diabetogênicos, glicocorticóides, adrenalina, glucagon ou o hormônio do crescimento, que pode ocorrer pela secreção excessiva, deficiente degradação ou administração exógena dos mesmos (NICHOLS, 1992). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, estão incluídos nesta categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino como neoplasias, pancreatite e outros (SOCIEDADE BRASILEIRA de

DIABETES, 2009). A pancreatite pode lesar células beta suficiente para causar DM. Em um estudo, 13% dos casos de cães diabéticos foram diagnosticados como tendo pancreatite (HESS et al., 2000)

É muito raro o diabetes mellitus não-insulinodependente ser reconhecido clinicamente nos cães. Foi descrita uma forma juvenil de diabetes mellitus, que se manifesta na maturidade, semelhante ao diabetes juvenil humano, sendo uma subclassificação do diabetes mellitus insulino dependente, embora rara (BUNN, GABBAY e GALLOP, 2008; HURTY e FLATLAND, 2005).

### **3.4 DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico do diabetes mellitus baseia-se fundamentalmente no aumento da glicose plasmática em jejum ou um teste de tolerância à glicose por via oral ou intravenosa (KANEKO et al., 2008).

A glicose plasmática é influenciada por muitos fatores, e não é surpreendente que existam muitas causas para hiperglicemia.

O diagnóstico do DM para humanos é realizado de acordo com os sintomas do DM, como poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicável combinados com uma glicemia casual superior ou igual a 200,0 mg/dL, ou glicose em jejum prévio de 8 a 12 horas superior ou igual a 126,0 mg/dL, ou glicose superior ou igual a 200,0 mg/dL duas horas após teste de tolerância à glicose. Para cães, glicemia casual superior a 200,0 mg/dL pode ser usada como critério para diagnóstico. O limite de decisão de 126,0 mg/dL para humanos pode ser usado associado com vários fatores incluindo correlação com o teste de tolerância à glicose e complicações por hiperglicemia persistente (retinopatia e doença arterial) (GAVIN, 2000).

A avaliação laboratorial mínima, na suspeita de diabetes mellitus deve incluir urinálise com cultura bacteriana, lipase sérica, glicemia em jejum, hemograma, provas de função renal (uréia e creatinina), proteínas totais e frações, alanina aminotransferase sérica (ALT) e fosfatase alcalina sérica (NELSON, 1994). Os animais que apresentam vômito, diarreia, anorexia e desidratação devem ser avaliados quanto à pancreatite, bem como em relação ao equilíbrio eletrolítico e ácido-básico (NELSON, FELDMAN, 1998 e RAND et al., 2002).

Em animais com suspeita de diabetes mellitus, mas não confirmados pela glicemia em jejum, podem ser submetidos ao teste de tolerância à glicose. Uma forma de realizar este teste é por meio de injeção intravenosa de 4 mg/Kg de uma solução de glicose 50%, após jejum noturno. Em outro vaso, devem ser feitas coletas de sangue para avaliar a concentração plasmática da glicose 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos após o desafio com glicose (KANEKO et al., 2008). Em animais não diabéticos, a glicemia atinge os valores normais em 45 a 60 minutos após a injeção (O' BRIEN et al., 1985).

O teste de tolerância a glicose (GTT) se refere a quantidade de glicose que pode ser ingerido por um animal sem produzir glicosúria. Em um animal sadio, não diabético, a ausência de glicosúria indica uma elevação limitada de glicose no sangue, sem ultrapassar o limiar renal. O animal com aumento a tolerância da glicose é aquele que tem aumento limitado e uma rápida queda da glicose no sangue, ou seja, pode tolerar a glicose extra. O animal com tolerância diminuída tem aumento excessivo e regresso lento da glicose ao seu nível basal, não pode tolerar a glicose extra. Este é o tipo de curva típica de um animal diabético. Para obter melhores resultados, a dieta deve ser normalizada e padronizada com a ingestão de 100 a 200g de carboidrato durante três dias antes da realização do teste (KANEKO et al., 2008).

O teste de tolerância oral à glicose (TOTG) descreve uma curva de glicose no sangue após a administração oral de uma dose de glicose (KRUTH et al., 1982). O TOTG tem sido utilizado em cães com a ingestão de 4g de glicose /kg e pode ser misturado com algumas gramas de carne para facilitar a ingestão. Uma amostra de sangue em jejum deve ser coletada e as demais amostras devem ser coletadas com um intervalo de 30 minutos por 3 horas. O valor máximo de glicose para cães não diabéticos é de 140,0 mg/dL uma hora após a ingestão e deve voltar ao nível normal de 65 a 110 mg/dL em 2 a 3 horas após a ingestão. O TOTG pode ser simplificado coletando uma única amostra de sangue para a determinação de glicose duas horas após ingestão oral de glicose, também conhecida por glicose pós-prandial de duas horas (HOENING, 2002; KANEKO et al., 2008).

### 3.5 TRATAMENTO

O tratamento do diabetes mellitus em cães insulino dependentes recém-diagnosticados é caracterizado por controle glicêmico bom em resposta à pequenas doses de insulina, provavelmente devido à presença de células  $\beta$  pancreáticas ainda funcionais. O controle glicêmico torna-se mais difícil e as doses de insulina geralmente aumentam dentro de três a seis meses do início do tratamento à medida que as células  $\beta$  funcionais residuais são destruídas, com a consequente diminuição na secreção de insulina endógena (APPLETON et al., 2001).

O cães diabéticos tipo 1 são insulino dependentes e necessitam de insulina de forma contínua. Geralmente são necessárias duas aplicações ao dia e o tratamento é bastante individualizado (APPLETON et al., 2001). A terapia inicial deve ser associada a cada tipo de diabetes mellitus. A finalidade terapêutica é restabelecer a homeostasia normal do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (HOENIG, 2002).

Como protocolo para o tratamento a insulino terapia é indicada para cães desde o momento em que é diagnosticado o diabetes mellitus tipo I. A insulina deve ser aplicada pela manhã em dose única. Cães de pequeno porte (peso menor de 15 Kg) devem receber cerca de 1 U/Kg. Cães de porte grande com peso superior a 25 Kg devem receber 0,5 U/Kg de insulina. Geralmente, quanto maior o animal, menor a dose necessária por Kg de peso corporal. É preferível iniciar-se com doses relativamente pequenas, uma vez que é mais fácil o controle da hiperglicemia do que a crise hipoglicêmica. Após o início da terapia insulínica, o animal deve receber alimentação balanceada e específica para seu peso corpóreo. Cães pequenos devem receber cerca de 75 Kcal/Kg de peso ao dia enquanto que os cães maiores recebem 40 Kcal/Kg/dia. Os animais devem receber aproximadamente metade da sua ração calórica após a injeção de insulina e o restante 6 a 12 horas mais tarde (KANEKO et al., 2008).

O sucesso do tratamento depende da agilidade ou precocidade com que o diagnóstico é feito e também da escolha correta da terapia. Na opção por insulina é de extrema importância que as doses sejam administradas em níveis corretos para manter a glicemia do animal o mais próximo possível dos níveis normais. Para certificar-se que o tratamento está sendo correto deve-se realizar exames que monitorem a terapia (DENNIS, 1989).



### 3.6 MONITORAMENTO

A hemoglobina glicada e a frutossamina são muito úteis para monitorar o tratamento do DM em cães, pois são considerados, em seres humanos, como exames padrão ouro para o monitoramento do tratamento desta doença (DENNIS, 1989).

#### 3.6.1 HEMOGLOBINA GLICADA

A hemoglobina glicada, também denominada A1c, refere-se a um conjunto de substâncias formada pelas reações entre a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. Este processo de glicação de proteínas envolve uma ligação não enzimática e permanente de açúcares redutores com a glicose (BRY et al., 2001).

A HbA é a forma principal da hemoglobina, sendo que a HbAO é o principal componente da HbA. Na prática, esta corresponde à chamada fração da hemoglobina glicada da HbA. Por outro lado, HbA1 total corresponde as formas de HbA carregadas mais negativamente devido a adição de glicose ou outros carboidratos (NATHAN, 2008).

Existem vários subtipos de HbA1 cromatograficamente distintos, tais como HbA1a1, HbA1a2, HbA1b e HbA1c. A fração HbA1c, ou apenas A1c, é a que se refere à hemoglobina glicada propriamente dita, cujo terminal valina da cadeia beta está ligado à glicose por meio de uma ligação estável e irreversível. A fração A1c é a mais importante e mais estudada. Dependendo do método de análise laboratorial, a fração A1c corresponde a cerca de 3% a 6% da HbA total em pacientes humanos sadios e não diabéticos, alcançando até 20% ou mais em diabéticos mal controlados. Os valores de referência devem ser bem estabelecidos, por que quando os valores encontrados em um paciente diabético estão acima do limite superior de referência, está indicada a revisão do esquema terapêutico em vigor (KILPATRICK, 2008).

Além da hemoglobina glicada, outras proteínas que estão livres no plasma também podem se ligar a glicose originando outras proteínas glicadas, como a frutossamina.

Segundo NATHAN et al., (2008), o processo de glicação de proteínas não se restringe apenas a ligação da glicose com a hemoglobina, formando a hemoglobina glicada. Ao contrário, esse processo estende-se, praticamente, a muitas proteínas do organismo, contribuindo para a geração dos chamados produtos finais da glicação avançada (“Advanced Glycation End products” = AGEs).

Do ponto de vista de recursos laboratoriais de avaliação do controle da glicemia, a glicação da albumina é outro processo decorrente da glicação das proteínas, gerando a chamada proteína glicada ou microalbumina, analito dosado na urina, considerado como melhor marcador do controle glicêmico do que a A1c, uma vez que a glicação da albumina não é afetada pela alteração no tempo de sobrevivência das hemácias, como acontece no teste de A1c, o qual pode ser influenciado pela presença de processos hemolíticos e de hemoglobinas anormais. Alguns autores consideram que o uso da microalbumina está especialmente indicado em pacientes diabéticos submetidos à hemodiálise. Entretanto, deve-se ressaltar que os níveis ideais de albumina glicada ainda não foram devidamente estabelecidos em humanos, e que os resultados deste teste podem ser influenciados pela presença de proteinúria maciça. O teste de albumina glicada ou microalbuminúrica reflete a média dos níveis glicêmicos das últimas duas a três semanas devido ao tempo de meia vida da albumina de aproximadamente 20 dias, enquanto que o teste de A1c reflete a média dos níveis glicêmicos dos últimos dois a quatro meses. Não é um teste regularmente disponível na prática laboratorial diária, e na medicina veterinária este teste ainda não é utilizado (ABE e MATSUMOTO, 2008).

Ao interpretar o resultado da A1c em humanos, é necessário considerar que os níveis médios mais recentes da glicemia são os que mais influenciam no valor da A1c. Aproximadamente 50% da A1c são formados no mês precedente ao exame, 25% no mês anterior a esse e os 25% remanescentes, no terceiro ou quarto mês que precede a coleta da amostra. A meia vida das hemácias é relativamente curta dura aproximadamente 120 dias na corrente sanguínea, e após este período são removidas principalmente pelo baço, pois já estão frágeis (TAHARA e SHIMA, 1993).

Segundo alguns autores, existe estreita correlação entre os níveis de A1C e os valores médios da glicose plasmática. Uma elevação de 1% na hemoglobina glicada corresponde a, aproximadamente, um aumento médio de 25 a 35 mg/dL na glicemia. Uma elevação de 3% indica que a glicemia média mantém-se acima de 200 mg/dL. As dosagens de glicose e A1c são complementares para avaliação do

controle do DM, pois fornecem informações distintas acerca dos níveis de glicemia sanguínea. Como citado anteriormente, os resultados de A1c refletem a glicemia média no intervalo de dois a três meses antecedentes a coleta, enquanto que a dosagem da glicemia unicamente no momento da coleta da amostra de sangue (SACKS, 2003; SAUDEK et al., 2006).

Em humanos, os testes de A1C devem ser realizados pelo menos duas vezes ao ano para todos os portadores de diabetes mellitus. Quando os diabéticos não conseguem atingir um controle adequado, a recomendação é realizar a dosagem de A1C a cada três meses. A dosagem de A1c está indicada tanto para os diabéticos do tipo 1 como para os do tipo 2, sendo que a meta a ser atingida tanto para um quanto para outro é igual (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

Os métodos utilizados para determinação de hemoglobina glicada em humanos são bem descritos, usando anticorpo monoclonal para quatro grupos aminoterminais ligados à hemoglobina (ANDRIOLO et al., 2008). Este método também pode ser aplicado para determinar a hemoglobina glicada em cães, por que a estrutura da hemoglobina do cão é muito similar a estrutura da hemoglobina de humanos (BRIMHALL et al., 1997).

Concentrações de hemoglobina glicada persistentemente acima dos níveis normais estão associadas a um risco progressivamente maior de complicações crônicas: afetando os rins, nervos, grandes e pequenos vasos sanguíneos (MARCA et al., 2000b). Para níveis de hemoglobina glicada acima do limite superior indica-se a revisão do esquema terapêutico em vigor (CHANDALIA e KRISHNASWAMY, 2002).

#### **3.6.1.1 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA**

Existem várias metodologias disponíveis para determinação da hemoglobina glicada e recomenda-se que os laboratórios utilizem preferencialmente os métodos de ensaio certificados pelo “National Glycohemoglobin Standardization Program” (NGSP). Os métodos diagnósticos para a dosagem da hemoglobina glicada mais usados no Brasil são: cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia por afinidade ao borato, eletroforese, imunoensaio turbidimétrico e resina de troca iônica.

O método para determinação da hemoglobina glicada por resina de troca iônica é um dos mais utilizados nos laboratórios de análises clínicas por ser de baixo custo, de boa reprodutibilidade e aplicável a maioria dos equipamentos disponíveis nos laboratórios (SACKS et al., 2002). A obtenção da hemoglobina glicada ocorre em etapas. Quando o sangue entra em contato com o reagente de lise, contendo um solubilizante (detergente) de proteína e alta concentração de íons borato, sofre hemólise total, ocorrendo a eliminação da fração lábil, as bases de Schiff. A preparação hemolisada é então misturada por 5 minutos com uma resina catiônica. Durante este tempo, a hemoglobina HbAO acopla-se a resina, e a hemoglobina glicada permanece no sobrenadante. Após o período de 5 minutos é realizada uma centrifugação para separar a resina do sobrenadante, que contém a hemoglobina glicada. A nova técnica com o princípio da centrifugação é mais precisa e menos sujeita a erros, pois a etapa de centrifugação elimina os possíveis interferentes que podem causar resultados falsamente aumentados. A concentração da hemoglobina glicada é determinada pela medida da absorbância das frações hemoglobina glicada e hemoglobina total em 415 nm ou 405 nm. Em seguida compara-se a relação de absorbância entre as duas hemoglobinas com a obtida do padrão processado da mesma forma que a amostra (NATHAN, 2008).

### **3.6.2 FRUTOSAMINA**

A frutossamina é o nome genérico das proteínas glicadas que após rearranjo molecular, transforma-se em uma cetoamina estável denominada genericamente de frutossamina, das quais a maior parcela está ligada à albumina, que se constitui na maior massa protéica plasmática depois da hemoglobina. Assim como a formação da hemoglobina glicada, a frutossamina é resultante da interação da glicose plasmática e a lisina presente na molécula de albumina e em outras proteínas livres no plasma, decorrente de uma modificação não enzimática (JOHNSON, 1983). No cão, a dosagem da frutossamina reflete os níveis de glicose plasmática uma ou duas semanas antecedentes ao teste por que as proteínas totais e a albumina tem meia-vida de 2 a 3 semanas, respectivamente (JENSEN e AAES, 1992; KAWAMOTO et al., 1992). Assim, a frutossamina está elevada em todos os casos de diabetes sob controle recente inadequado (JOHNSON, 1983).

A realização do teste de frutossamina pode detectar alterações nos níveis glicêmicos recentes e permite uma intervenção clínica em tempo mais hábil. Além disso, o ensaio de frutossamina é um ensaio colorimétrico que pode ser realizado nos laboratórios de análises clínicas (KANEKO et al., 2008).

#### **3.6.2.1 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA FRUTOSAMINA**

A nova metodologia para a determinação da frutossamina tem como princípio a ligação da glicose aos grupamentos das proteínas formando uma base de Schiff (aldimina), que após um rearranjo molecular transforma-se em uma cetoamina estável denominada genericamente frutossamina. Em pH alcalino, a frutossamina é convertida à forma enólica, que reduz o nitroazul de tetrazólio (NBT) a uma cor azul púrpura. Nesta prova, outros agentes redutores podem estar presentes na amostra causando interferência no ensaio. No novo reagente enzimático colorimétrico para a determinação de frutossamina foi incorporada a uricase, um agente clarificador à base de detergente com o objetivo de minimizar os interferentes presentes na amostra. A mensuração da diferença de absorbância em espectrofotômetro, após incubação por 10 a 15 minutos é proporcional a concentração de frutossamina na amostra (WATANABE et al., 2007).

## 9. REFERÊNCIAS

AKOL, K.G.; WADDLE, J.R.; EILDING, P. Glycated hemoglobin and fructosamine in diabetic and nondiabetic cats. **Journal American Hospital Association**, 1992; 28:227-231.

ABE, M.; MATSUMOTO, K. Glycated Hemoglobin or Glycated Albumin for Assessment of Glicemic Control in Hemodialysis Patients with Diabetes. **National Clinical Practice Nephrology**, 2008; 4:482-483. Disponível em: <<http://medscape.com/viewarticle/580573>>. Acesso em 21 de novembro de 2010.

ANDRIOLO A., VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico e acompanhamento laboratorial do diabetes mellitus. In: Andriolo A. (org.). **Guias de Medicina Laboratorial e Hospitalar / Medicina Laboratorial**. 1.ed. São Paulo, Manole, 2008; p.37-42.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Position Statement. Diabetes Care**, v. 27, suppl. 1, p. S4-10, 2004.

APLLETON, D. J.; RAND, J. S. & SULVOLD, G. D. 2001. Insulin sensitivity decreases with obesity, and cats with low insulin sensitivity are at greater risk of glucose intolerance with weight gain. **Journal Feline Medicine Surgery**. 3: 211-228.

APLLETON, D. J.; RAND, J. S.; SULVOLD, G. D. 2005. Basal plasma insulin and homeostasis model assessment (HOMA) are indicators of insulin sensitivity in dogs. **Journal Feline Medicine Surgery** 7:183-193.

Atualização brasileira sobre diabetes. **SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES**. Versão atualizada 2009. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/atualizaodiabetes2009.pdf>>. Acesso em 10 de agosto de 2010.

BROBST, D. F. 1997. Pancreatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVERY, J. W. & BRUSS, M. L. (ed). **Clinical Biochemistry or Domestic Animals**. 5<sup>th</sup> ed. Academic press, San Diego, p. 353-366.

BRY, L.; CHEN, P. C.; SACKS, D. B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assay for glycohemoglobin. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 153-63, 2001.

BRIMHAELL, B., DUERST, M. & JONES, R. T. 1997. The amino acid sequence of dog (canis familiaris) haemoglobin. **Journal of Molecular Evolution** 9, 231-235.

BUNN, H. F., GABBAY, K. H., and GALLOP, P. M. 2008. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. **Science** 200, 21 – 27.

Consenso Brasileiro Sobre Diabetes -2002- Diagnóstico e Classificação do Diabetes Melito e Tratamento do Diabetes Melito do Tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2007. Disponível em: [http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia\\_diverso.php?id=5&tp=3](http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia_diverso.php?id=5&tp=3). Acesso em 21 de novembro de 2010.

CATCHPOLE, B.; RISTIC, J. M.; FLEEMAN, L. M.; DAVISON, L. J. 2005. Canine diabetes mellitus: Can old dog teach us new tricks. **Diabetologia** 48:1948-1956.

CHANDALIA, H. B.; KRISHNASWAMY, P. R. Glycated hemoglobin. **Current Science**, v. 12, n. 83, p. 1522-32, 2002.

CRISTOPHER, M. M.; O'NEIL, S. 2000. Effect of specimen collection and storage on blood glucose and lactate concentrations in healthy, hyperthyroid and diabetic cats. **Veterinary Clinical Pathology**, 29:22-28.

COELI, C. M.; FERREIRA, L. G. F. D.; DRBAL, M. M.; VERAS, R. P.; CAMARGO, K. M. & CASCÃO A. M. 2003. Mortalidade em idosos por diabetes mellitus como causa básica e associada. **Revista de Saúde Pública** 36: 135-140.

DE MARCO V., AMARAL R.C., JERICÓ M.M., SILVA R.D. & SIMÕES D.M. Diagnóstico de Diabetes mellitus na espécie canina e avaliação a longo prazo da terapia insulínica através das concentrações séricas de hemoglobina glicosilada. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. 2: 23-28, 1999.

DENNIS, J. S. Glycosylated hemoglobins in dogs. **Compendium Continuing Education** 1989; 11:717-720,726.

DODSON, P. M. Diabetic retinopathy: treatment and prevention. **Diabetic and Vascular Disease Research**. v 4, n 3, p. 9-11, 2007.

EIGENMANN, J. E.; EIGENMANN, R. Y.; RIJINBERK, A.; VAN DER GAAG, I.; ZAPF, J.; FROESCH, E. R. 1983. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine and acromegaly. **Acta Endocrinol**, 104:167-176.

ELLIOT D. A.; NELSON RW, REUCH CE, et al: Comparison of serum fructosamine and blood glycosylated hemoglobin concentrations for assessment of glyemic control in cats and dogs with diabetes mellitus. **JAVMA** 214 (12): 1794-1798, 1999.

FARIA, P. F. Diabetes mellitus em cães. **Acta Veterinária Brasília**. v 1, p 8-22, 2007.

FELDMAN, B. C. 1989. Enfermidades Del pâncreas endócrino. In: ETTINGER, S. J. (ed). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**: enfermedades del perro y el gato. 2ed. v.3. Inter-Médica, Buenos Aires, p1511-1541.

FORD, S. L.; NELSON R. W.; FELDMAN E. C. & NIWA D. 1993. Insulin resistance in three dogs with hypothyroidism and diabetes mellitus. **Journal American Veterinary Medicine Association**. 202:1478-1480.

GAVIN, J. R. 2000. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, 23 (Suppl 1): S4-S19.

GOLDSTEIN, D. E. Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1761-73, 2004.

HESS, R. S.; SAUNDERS, M.; VAN WINKLE, T. J.; WARD, C. R. 2000. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases 1993-1998. **Journal American Veterinary Medicine Association**, 217:1166-1173.

HOENING, M. 2002. Comparative aspects of diabetes mellitus in dog and cats. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 197:221-229.

HOENING, M.; DAWE, D. L. 1992. A qualitative assay for beta cell antibodies: Preliminary results in dogs with diabetes mellitus. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 32:195-203.

HURTY, C. A.; FLATLAND, B. 2005. Feline acromegaly: a review of the syndrome. **Journal American Animal Hospital Association** 41:292-297.

JENSEN A.L.; AAES H. 1992. Reference interval and critical difference for canine serum fructosamine concentration. **Veterinary Research Communications**, 16, 317-325.

JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER J.R.; Clinical Chemistry. **Acta Veterinaria Brasílica**. 1983; 127:87-95.

KANEKO, J. J., 1997. Carbohydrate metabolism and its disease. In: KANEKO J. J., HARVEY J. W. & BRUSS M. L. eds. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press; 45-81.

KANEKO, J. J., 2008. Carbohydrate metabolism and its disease. In: KANEKO J.J., HARVEY J. W. & BRUSS M. L. eds. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. San Diego: p. 62-70.

KAWAMOTO, M.; KANEKO, J.J.; HEUSNER, A.A.; FELDMANN, E.C. and KOIZUMI, I., 1992. Relation of fructosamine to serum protein albumin and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 53, 851-855.

KILPATRICK, E.S. Haemoglobin A1C in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. **Clinical Pathology**, v. 61, p. 977-82, 2008.

KITABCHI, A. E.; UMPIERREZ, G. E.; MURPHY, M. B.; BARRETH, E. J.; KREISBERG, R. A.; MALONE, J. I.; WALL, B. M. Management of hyperglycemia crises in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v.24, n.1,p. 131-153, 2001.



KRUTH, S. A.; FELDMAN E. C.; KENNEDY, P. C. 1982. Insulin secreting islet cell tumor: establishing a diagnosis and the clinical cause. **Journal American Veterinary Medicine Association**. 181, 54 – 58.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial do pâncreas endócrino e do metabolismo de glicose. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, SP, ROCA, 2007, p.403-425.

LEROY, J. Diabetes sucré. Encyclopédie Vétérinaire. **Endocrinologie**, 0900 p.9. Elsevier, Paris. 1999.

MAHAFFEY, E. A.; and CORNELIUS, L. M. Glycosylated hemoglobin in: diabetic and non-diabetic dogs. **Journal American Veterinary Association**, 1982. 180, 635-637.

MARCA M. C.; LOSTE, A.; RAMOS, J. J. Blood glycated hemoglobin evaluation in sick dogs. **Canine Journal Veterinary Research** 64:141-144, 2000a.

MARCA, M. C.; LOSTE, A.; RAMOS, J.J. Effect of acute hyperglycaemia on the serum fructosamine and blood glycated haemoglobin concentrations in canine samples. **Veterinary Research Common** 24:11-16, 2000b.

MARMOR, M.; WILWBERG, P.; GLICKMAN, L. T.; PRIESTER, W. A.; CYPESS, R. H.; HURVITZ, A. I. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.3 p. 465-470, 2000.

MELLANBY, R. J.; HERRTAGE, M. E. 2002. Insulinoma in a normalglycaemic dog with low serum fructosamine. **Journal Small Animals Practice** 43:506-508.

NATHAN, D. M. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. **Diabetes Care**, v. 31, p. 1-16, 2008.

NATHAN, D. M.; KUENEN, J.; BORG, R.; ZHENG, H.; SCHOENFELD, D.; HEINE, R. J. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. **Diabetes Care** 2008; 31:1473-1478.

NELSON, W. N., Distúrbios do pâncreas endócrino. In: NELSON, R. W. & COUTO, C. G. (ed). **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994. p.413-430.

NELSON, R. W. Distúrbios do pâncreas endócrino. In: Ettinger, S. J. (ed). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 3.ed. São Paulo, 1992. P1752-1798.

NELSON, R. W. Diabetes mellitus. In: MORGAN, R. V. (ed). **Handbook of Small Animal Practice**. New York: Churchill Livingstone, 2004. p. 527-531.

NELSON, R. W.; FELDEMAN, E. C. Diabetes mellitus canino. In: Kirk, R. W. (ed). **Atualização Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Manole, 1998. V. 2, p. 1252-1261.

NELSON, R. W.; ETTINGER S. J.; FELDEMAN E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária** - Diabetes Mellitus. Ed. Guanabara Koogan. 5ª Edição. p1516-1539, 2004.

NGUYEN, P.; DUMON, H.; V.; POUTEACE, E. Measurement of postprandial incremental glucose and insulin changes in health dogs: influence of food adaptation and length of time of blood sampling. **Journal of Nutrition**, v.128, n.12 suppl., p.2659-2662, 1998.

NICHOLS, R. Recognizing and treating canine and feline diabetes mellitus. **Veterinary Medicine**, v.87, n.3, p.211-222, 1992.

O' BRIEN, T. D.; HAYDEN, D. W.; JOHNSON, K. W. and STEVENS, J. B. 1985. High dose intravenous glucose tolerance test and serum insulin and glucagon levels in diabetic and non-diabetic dogs: relationship to insular amyloidosis. **Veterinary Pathol.** 22, 250 – 261.

POWERS, A. Diabetes mellitus. In: KASPER D. L.; BRAUNWALD, E.; FAUSI, A. S.; HAUSER, S.L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. Ed. McGraw-Hill. 16ª edição. p2152-2180, 2005.

RAND, J. S.; KIMNAIRD, E.; BAGLIONI, A.; BLACKSHAW, J.; PRIEST, J. 2002. Acute stress hyperglycemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine. **Journal Veterinary Internal Medicine** 16:123-132.

SACKS, D. B. Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis: **Problem Solved? Clinical Chemistry** 2003; 49; 1245-1247.

SACKS, D. B. Translating hemoglobin A1C into average blood glucose: implications for clinical chemistry. **Clinical Chemistry** 2008; 54:1756-1758.

SACKS, D. B.; BRUNS, D. E.; GOLDESTINE, D. E. MACLAREN, N. K. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus-The National Academy of Clinical Biochemistry-Laboratory Medicine Practice Guidelines, 2002. Disponível em: [http://www.nacb.org/Impg/diabetes\\_Impg\\_pub.stm](http://www.nacb.org/Impg/diabetes_Impg_pub.stm). Acesso em 20 de março de 2011.

SAUDEK, C. D.; DERR, R. L.; KALYANI, R. R. Assessing glycemia in diabetes using self-monitoring blood glucose and hemoglobin A1C. **Jama**, v. 295, p. 1688-97, 2006.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de Patologia Clínica. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.594-595, 2011.

TAHARA, Y.; SHIMA, K. The response of GHb to stepwise plasma glucose change over in diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 16, p. 1313-4, 1993.

WATANBE, D.; NAKARA, H.; AKAGI, K.; ISHII, T.; MIZUGUCHI, H.; NAGASHIMA, Y.; OKANIWA, A. 2077. Oral glucose tolerance test and determination of serum fructosamine level in beagle dogs. **Journal Toxicol Science** 29:33-36.

WOOD, P. A.; SMITH, J. E. 1980. Elevation rate of glycosylated hemoglobins in dogs after induction of experimental Diabetes mellitus. **Metabilism**, 31, 906-909.

## CAPÍTULO II

### VALORES DE REFERÊNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS DA HEMOGLOBINA GLICADA E DA FRUTOSAMINA EM CÃES

### REFERENCE VALUES FOR THE BLOOD CONCENTRATION OF GLICOSILATED HEMOGLOBIN AND FRUCTOSAMIN IN DOGS

#### RESUMO

O *Diabetes mellitus* ocorre pelo aumento da concentração da glicose sanguínea devido à deficiência parcial ou total de insulina. O diagnóstico da doença é feito pela dosagem de glicose no sangue em jejum ou pela curva glicêmica. A maior dificuldade na medicina veterinária está relacionada ao controle da doença. As ferramentas laboratoriais existentes, hemoglobina glicada e frutosamina, são pouco utilizadas devido à escassez de dados técnicos e divergência de valores de referência. Foram utilizados 100 cães sadios, machos e fêmeas, de dois a oito anos de idade, para determinar os valores sanguíneos de referência da hemoglobina glicada e frutosamina. As metodologias empregadas foram a resina de troca iônica, para hemoglobina glicada e o método cinético por redução do azul de nitrotetrazólio para a frutosamina. Os intervalos de variação dos valores de hemoglobina glicada para machos foram de 5,23-6,97% e para fêmeas de 5,35-7,05%. Os intervalos de variação dos valores para a frutosamina foram de 285,40-399,80  $\mu\text{mol/L}$  para machos e de 269,65-374,80  $\mu\text{mol/L}$  para fêmeas. Para ambos os parâmetros não houve diferença significativa entre machos e fêmeas ( $p>0,05$ ). Desta forma, os valores médios de hemoglobina glicada de 5,3-7,01% e de frutosamina de 277,52-387,3  $\mu\text{mol/L}$  podem ser adotados como referência para cães machos e fêmeas.

PALAVRAS-CHAVE: cão, diabetes, hemoglobina glicada, frutosamina.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus occurs because of the increase of blood glucose due to a partial or total lack of insulin. The diagnosis of this disease is made by the measurement of blood glucose level in fast or by the glycemic curve. The greatest difficulty in veterinary medicine is to monitor the control of the disease. Hemoglobin glycosylated and fructosamine levels are not commonly used due to a lack of reference values and technical data. One hundred healthy dogs, both male and females, ranging from 2 to 8 years, were used to establish the reference values of hemoglobin glycosylated and fructosamine. The methodologies used were the ionic resin to measure the hemoglobin glycosylated and the kinetic method by the reduction of blue nitroterazolium for fructosamine. The hemoglobin glycosylated values for male were 5.23-6.97% and 5.35-7.05% for females. The fructosamine values were 285.40-399.80  $\mu\text{mol/L}$  for males and 269.65-374.80  $\mu\text{mol/L}$  for females. There weren't any significative differences for both parameters between males and females ( $p>0,05$ ). The mean values of hemoglobin glycosylated of 5.3-7.01% and 277.52-387.30  $\mu\text{mol/L}$  for fructosamine can be used as a reference value for both males and females dogs.

KEY-WORDS: Dog, diabetes, hemoglobin glycosylated, fructosamine.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* é uma doença caracterizada por hiperglicemia devido a deficiência de produção e/ou de ação da insulina (AKOL et al., 1992). A Diabetes mellitus é comum em seres humanos e nas últimas décadas a ocorrência da doença aumentou consideravelmente em cães e gatos, provavelmente devido ao aumento da expectativa de vida dos animais. Em cães, o diabetes mellitus pode ocorrer em qualquer idade, mas animais idosos apresentam maior prevalência. A maioria dos cães que apresentam a doença tem entre quatro e 14 anos de idade, com pico de prevalência entre sete a nove anos de idade (PLOTNICK e GRECO, 1995; HOENING, 2002).

O diagnóstico específico da diabetes mellitus é realizado por mensuração da concentração da glicose sanguínea, detecção de glicosúria e em casos suspeitos, pela curva glicêmica (KANEKO, 2008).

A doença é de difícil controle e o sucesso do tratamento depende de fatores como a precocidade no diagnóstico, empenho do médico veterinário em informar e orientar o proprietário sobre a doença, solicitação de exames para monitorar o tratamento e da insulinoaterapia para manter a glicemia normal (RAZ et al., 2005).

O monitoramento do tratamento é importante porque permite avaliar o controle do diabetes e evitar possíveis complicações provocadas pelo diabetes mal controlado (WILLARD, 2004). As dosagens sanguíneas da hemoglobina glicada e da frutossamina são úteis para monitorar a eficiência do tratamento porque refletem o histórico dos níveis de glicemia a longo prazo, sendo considerados em seres humanos como exames padrão ouro para monitorar o tratamento da doença (MARCA, 2000).

A hemoglobina glicada ocorre pela ligação não enzimática da hemoglobina A (HbA) à glicose, de forma contínua, lenta e irreversível (SUMITA e ANDRIOLO, 2006). A hemácia é permeável à molécula de glicose, desta forma, a hemoglobina fica exposta as mesmas concentrações da glicose plasmática e a hemoglobina glicada acumula-se dentro das hemácias. Em seres humanos a dosagem da hemoglobina glicada avalia o nível de controle do diabetes mellitus, sendo indicada para todos os portadores da doença. Porém, ainda não existem evidências que justifiquem a realização desse exame com finalidade de diagnóstico, mas apenas para acompanhar o tratamento (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2004).

A frutossamina também é uma proteína glicada, resultante da ligação da glicose com a proteína sérica total ou à albumina. De modo similar a formação da hemoglobina glicada, a frutossamina também é decorrente de ligação não enzimática, irreversível e dependente dos valores da glicemia (JOHNSON, 1983; KANEKO, 2008). No cão, a dosagem da frutossamina reflete os níveis de glicose plasmática uma ou duas semanas antecedentes ao teste (JENSEN e AAES, 1992; KAWAMOTO et al., 1992). Assim, as concentrações de frutossamina estão elevadas em todos os casos de diabetes sob controle inadequado (JOHNSON, 1983).

O monitoramento do diabetes em cães e gatos, por determinação das concentrações sanguíneas das proteínas glicadas, não é realizado na rotina clínica. Existem poucos relatos de parâmetros de referência para hemoglobina glicada e frutossamina em animais de companhia e nesses, os valores geralmente são discrepantes e variáveis, de acordo com a metodologia adotada. Os parâmetros de referência para a hemoglobina glicada e frutossamina encontrados na literatura foram determinados em de 1983 a 1999, são referências antigas e as metodologias adotadas ainda não eram padronizadas por um método de referência. Além disso, foram determinados em poucos animais (KANEKO, 2008).

Os objetivos deste estudo foram determinar os valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina em cães machos e fêmeas e padronizar a metodologia de dosagens das concentrações sanguíneas da hemoglobina glicada e da frutossamina.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 100 cães machos e fêmeas, sendo 28 machos e 72 fêmeas saudáveis, com níveis glicêmicos normais, atendidos pelos médicos veterinários na rotina da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, Curitiba (UFPR). Os animais selecionados para o estudo obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: idade de dois a oito anos, clinicamente saudáveis e com níveis de glicose sanguínea de até 110,0 mg/dL. Foram coletadas amostras de sangue por venopunção da jugular, sendo 3,0mL para a realização de hemograma e hemoglobina glicada (em tubo com anticoagulante EDTA) e 3,0mL sem anticoagulante para a obtenção do soro. No soro foram determinadas as concentrações da glicose, da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, uréia, creatinina, proteínas totais, albumina e frutamina.

### **2.1 HEMOGRAMA**

O hemograma foi realizado para nos certificarmos que os animais eram saudáveis, onde foram determinados o número total de eritrócitos e de leucócitos, além da concentração de hemoglobina, no contador automático de células sanguíneas CELM CC530 (CELM, Barueri, Brasil). O volume globular (micro-hematócrito) foi realizado pela técnica do micro-hematócrito. Foram determinados o volume globular médio (VGM) e a concentração da hemoglobina globular média (CHGM) (WANER e HARRUS, 2000). Os esfregaços de sangue foram corados pela técnica de Romanowski (Panótico Rápido LB, Laborclin, Pinhais, Brasil), para contagem diferencial de leucócitos, avaliação morfológica dos leucócitos e dos eritrócitos.



## 2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Além do hemograma também foram feitas análises bioquímicas para comprovarmos a sanidade dos animais utilizados no estudo. As análises bioquímicas foram feitas no analisador semi-automático CELM SBA 200 (CELM, Barueri, Brasil) com kits comerciais (Human do Brasil, (Itabira, Brasil)).

As concentrações da glicose foram determinadas no soro pelo método enzima glicose oxidase. As concentrações de ALT e AST pelo método cinético UV, a fosfatase alcalina pelo método cinético otimizado (DGKC), a uréia pelo método GLDH, a creatinina pelo método cinético colorimétrico (Jaffé), as concentrações das proteínas totais pelo método do biureto e da albumina pelo método do verde de bromocresol. A hemoglobina glicada foi determinada pelo método de resina de troca iônica, com kit comercial (Human do Brasil, (Itabira, Brasil)). A frutossamina foi determinada pelo método cinético por redução do azul de nitrotetrazólio (NBT), com kit bioquímico da (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). A determinação da porcentagem das concentrações da hemoglobina glicada e da frutossamina foram feitas por leitura em espectrofotômetro Quick-Lab (Dreake, São José do Rio Preto, Brasil). Para a hemoglobina glicada utilizou-se o comprimento de onda de 405 nm e para frutossamina 530 nm.

## 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos valores sanguíneos da hemoglobina glicada e frutossamina, foram comparadas as médias de machos e fêmeas. Utilizou-se o teste t não pareado onde foram avaliados os resultados obtidos de 28 machos e 72 fêmeas, considerando-se diferença estatística significativa quando  $p < 0,05$  e com intervalo de confiança de 95% (SNEDECOR e COCHRAN, 1989).

#### 4. RESULTADOS

Os valores da hemoglobina glicada e frutossamina estão apresentados na Tabela 1. Para os valores da hemoglobina glicada e frutossamina não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas.

A glicemia média para os machos variou de 84,0 a 105,8 mg/dL e para as fêmeas de 82,9 a 107,5 mg/dL. Os valores da creatinina foram de 0,7 a 1,1 mg/dL e uréia de 31,7 a 48,3 mg/dL. Na função hepática, o valor de AST foi de 27,6 a 75,0 U/L; ALT de 36,5 a 76,5 U/L; fosfatase alcalina de 75,0 a 105,0 U/L. As proteínas totais foram de 5,9 a 7,1 g/dL; albumina de 3,1 a 3,9 g/dL e a globulina de 2,4 a 3,6 g/dL.

Tabela 1- Valores médios, desvio padrão e intervalos mínimo e máximo das concentrações sanguíneas de hemoglobina glicada, frutossamina e glicose em cães saudáveis, machos e fêmeas.

Parâmetros/Animais	Machos		Fêmeas		Média geral
Hb glicada (%)	6,10 ± 0,87 <sup>a</sup>	5,23-6,97	6,20 ± 0,85 <sup>a</sup>	5,35-7,05	6,20 ± 0,85
Frutossamina (µmol/L)	342,60±57,20 <sup>b</sup>	285,40-399,80	322,20±52,55 <sup>b</sup>	269,65-374,80	327,90±54,39
Glicose (mg/dL)	94,90 ± 10,90 <sup>c</sup>	84,0-105,80	95,20±12,30 <sup>c</sup>	82,90-107,50	95,10±11,90

Letras iguais na mesma coluna indicam médias sem diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, os valores de hemoglobina glicada obtidos para cães sadios machos foram de 5,23-6,97% e para fêmeas de 5,35-7,05%. Em estudos anteriores foram obtidos valores de 2,29% para cães não diabéticos e de 6,43% para cães diabéticos (MAHAFFEY e CORNELLIUS, 1982). Outro estudo em cães não diabéticos, o valor médio encontrado foi de 4,97% e em animais com diabetes mellitus o valor médio obtido foi de 9,63% (WOOD e SMITH, 1980). As possíveis razões para as diferenças nos valores estão diretamente relacionados com as metodologias utilizadas na determinação da hemoglobina glicada, pois as metodologias não eram padronizadas com um método de referência mundialmente como é hoje.

Os valores deste estudo foram obtidos com o método de resina de troca iônica para determinação da hemoglobina glicada, o mesmo utilizado em seres humanos e aprovado pela *Sociedade Brasileira de Diabetes*. De acordo com BRIMHAELL et al. (1997), os métodos utilizados para a determinação da hemoglobina glicada em seres humanos também podem ser empregados para cães, pois as frações da hemoglobina do eritrócito humano são idênticas às do eritrócito do cão.

No Brasil, DE MARCO et al. (1999), determinaram concentrações da hemoglobina glicada de 12 cães sadios e obtiveram valor médio de 5,85%. Os valores foram próximos ao deste trabalho e as metodologias utilizadas foram semelhantes nos dois estudos. Os autores supracitados, utilizaram como princípio a filtração da resina ligada a hemoglobina glicada que ainda não era padronizada pelo Comitê Internacional de Padronização da hemoglobina glicada.

A metodologia recente, utilizada neste estudo, teve como princípio a centrifugação da resina ligada com a hemoglobina, para eliminar possíveis interferentes presentes na amostra, como resíduos de hemoglobina não ligada a resina poderia passar pela membrana de filtração o que não ocorre na centrifugação onde todos os resíduos indesejáveis são sedimentados na centrifugação. O número de cães utilizados neste estudo (100) foi consideravelmente maior do que DE MARCO et al. (1999) e considerado representativo para estabelecer os valores de referência de parâmetros bioquímicos (SOLBERG, 1986).

A hemoglobina glicada reflete os níveis médios da glicose sanguínea dos dois meses anteriores a coleta da amostra, porque a hemácia do cão tem meia vida aproximada de 60 dias. Desta forma, o controle glicêmico do cão deve ser realizado determinando-se a hemoglobina glicada a cada dois meses. Nos animais com anemia ou policitemia, a dosagem da hemoglobina glicada não é indicada, porque está diretamente relacionada a quantidade de hemácias (KANEKO, 2008).

Os valores séricos da frutossamina, no presente estudo, foram obtidos por método cinético colorimétrico, sendo 285,40-399,80  $\mu\text{mol/L}$  para machos e de 269,65-374,80  $\mu\text{mol/L}$  para fêmeas.

JENSEN e AAES (1992) e ELLIOT et al. (1999) extrapolaram a metodologia utilizada em humanos para a medicina veterinária e determinaram os valores de referência da frutossamina em cães, nos Estados Unidos. Os autores estabeleceram valores de 279,70-322,30  $\mu\text{mol/L}$  e de 225,0-375,0  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente, semelhantes ao deste estudo.

A frutossamina sérica pode apresentar valores diminuídos em casos de hipoalbuminemia, hiperlipidemia, azotemia e no armazenamento do soro em temperatura ambiente (NELSON et al., 2004). Neste estudo os parâmetros bioquímicos dos cães avaliados estavam normais e as amostras foram armazenadas conforme orientação do kit utilizado, descartando-se a interferência e ocorrência de artefatos nos resultados.

A concentração da frutossamina sérica não é alterada pelo aumento agudo da glicemia, como ocorre no estresse. Desta forma, a determinação da frutossamina pode ser adotada para a avaliação do controle glicêmico, a cada três a seis meses, para verificar o efeito do estresse, elucidar discrepâncias entre histórico, exame físico e os exames de glicose sanguínea, e para avaliar as alterações na insulinoaterapia (ELLIOT et al., 1999).

Os valores séricos de frutossamina acima de 450,0-500,0  $\mu\text{mol/L}$  são indicativos de controle recente inadequado da glicemia e necessidade de ajustes na dose de insulina (NELSON et al., 2004).

Considerando que não houve diferença significativa nos valores de hemoglobina glicada e frutossamina, entre cães machos e fêmeas, pode-se adotar como referência o valor médio para ambos os sexos, como ocorre em seres humanos.

Os valores obtidos neste trabalho poderão ser utilizados para monitorar o controle glicêmico pela insulinoaterapia em cães diabéticos e a técnica poderá ser disponibilizada na rotina para Laboratórios de Patologia Clínica Veterinária.

## **6. CONCLUSÃO**

Os valores sanguíneos médios obtidos para hemoglobina glicada foram de 5,35-7,05% e para frutossamina de 273,51-382,29  $\mu\text{mol/L}$ . Estes valores podem ser utilizados para cães adultos saudáveis, machos e fêmeas. Os parâmetros estabelecidos segundo metodologias aprovadas pelo Comitê Internacional de Padronização da hemoglobina glicada, padronizadas para humanos, podem ser extrapolada para cães na rotina dos Laboratórios Clínicos Veterinários.

## **7. AGRADECIMENTOS**

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR;

Aos residentes e professores da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFPR.

## 8. REFERÊNCIAS

AKOL, K.G.; WADDLE, J.R.; EILDING, P. Glycated hemoglobin and fructosamine in diabetic and nondiabetic cats. **Journal American Hospital Association**, 1992; 28:227-231.

BRIMHAELL, B., DUERST, M. & JONES, R. T. 1997. The amino acid sequence of dog (canis familiaris) haemoglobin. **Journal of Molecular Evolution** 9, 231-235.

Consenso Brasileiro Sobre Diabetes -2002- Diagnóstico e Classificação do Diabetes Melito e Tratmento do Diabetes Melito do Tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2004. Disponível em: [http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia\\_diverso.php?id=5&tp=3](http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia_diverso.php?id=5&tp=3). Acesso em 21 de fevereiro de 2010.

DE MARCO V., AMARAL R.C., JERICÓ M.M., SILVA R.D. & SIMÕES D.M. Diagnóstico de Diabetes mellitus na espécie canina e avaliação a longo prazo da terapia insulínica através das concentrações séricas de hemoglobina glicosilada. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. 2: 23-28, 1999.

ELLIOT DA, NELSON RW, REUCH CE, et al: Comparison of serum fructosamine and blood glycosylated hemoglobin concentrations for assessment of glycemie control in cats and dogs with diabetes mellitus. **JAVMA** 214 (12): 1794-1798, 1999.

HOENING, M. 2002. Comparative aspects of diabetes mellitus in dog and cats. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 197:221-229.

JENSEN A.L., AAES H. 1992. Reference interval and critical difference for canine serum fructosamine concentration. **Veterinary Research Communications**, 16, 317-325.

JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER J.R.; Clinical Chemistry. **Acta Veterinaria Brasílica**. 1983; 127:87-95.

KANEKO, J. J., 2008 Carbohydrate metabolism and its disease. In: KANEKO J.J., HARVEY J. W. & BRUSS M. L. eds. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. San Diego: p. 62-70.

KAWAMOTO, M.; KANEKO, J.J.; HEUSNER, A.A.; FELDMANN, E.C. and KOIZUMI, I., 1992. Relation of fructosamina to serum protein albumin and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 53, 851-855.

MAHAFFEY, E.A.; CORNELIUS, L.M. 1982. Glycosylated hemoglobin in diabetic and nondiabetic dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n.6, 125-129.

MARCA M.C., LOSTE A. Blood glycated hemoglobin evaluation in sick dogs. **Canine Journal Veterinary Research** 64:141-144, 2000.

NELSON, R. W.; ETTINGER S. J.; FELDEMAN E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária** - Diabetes Mellitus. Ed. Guanabara Koogan. 5ª Edição. p1516-1539, 2004.

PLOTNICK, A. N.; GRECO, D. S.: Diagnosis of diabetes mellitus in dogs and cats. **Veterinary Clinical North America** 25:563-570, 1995.

RAZ, I.; ELDOR, R.; NAPRSTEK, Y., 2005. Immune modulation for prevention of type I diabetes mellitus. **Trends Biotechnol.** 23, 128-134.

SOLBERG, H. E. 1986 In: **Textbook of Clinical Chemistry** (N.W. Tietz, ed.), p. 356-386. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. 1989. **Statistical Methods**. Iowa State University Press, Ames.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, editorial, 2006.

WOOD, P. A.; SMITH, J. E. 1980. Elevation rate of glycosylated hemoglobins in dogs after induction of experimental diabetes mellitus. **Metabolism**, 31, 906-909.

WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of Inflammatory Disease. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 205-209.

WILLARD, M.D. 2004. Small Animal Diagnosis by Laboratory Methods In: NELSON, R.W.; WILLARD, M.D. **Endocrine, Metabolic, and Lipids Disorders**: NELSON. Cap.8, p.165-207.

### **CAPÍTULO III**

#### **DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SANGUÍENAS DE HEMOGLOBINA GLICADA E FRUTOSAMINA EM CÃES DIABÉTICOS SOB INSULINOTERAPIA**

#### **DETERMINATION OF THE BLOOD CONCENTRATION OF GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN AND FRUCTOSAMINE IN DIABETIC DOGS UNDERGOING INSULIN THERAPY**

#### **RESUMO**

O *Diabetes mellitus* (DM) ocorre devido à destruição das células beta das ilhotas do pâncreas, por um defeito na secreção de insulina ou nos receptores de insulina. O diagnóstico laboratorial é determinado pela dosagem da glicemia em jejum, ou na dosagem de glicose no sangue coletado após teste de tolerância oral de glicose. Os principais sinais da DM são: poliúria, polidipsia, polifagia e glicosúria. Após o diagnóstico e tratamento da DM deve-se monitorar e controlar a doença pelas dosagens periódicas das concentrações sanguíneas de hemoglobina glicada e frutossamina. Estes parâmetros são muito utilizados em seres humanos, com valores de referência definidos, metodologias atualizadas e padronizadas. Neste estudo foram determinadas as concentrações de hemoglobina glicada e frutossamina de 19 cães diabéticos para avaliar essas dosagens no DM. Os valores médios obtidos para hemoglobina glicada foram de 10,3%, para frutossamina de 687,0  $\mu\text{mol/L}$  e glicose de 494,2 mg/dL. Os valores são superiores aos valores de referência para cães não diabéticos, demonstrando que as ferramentas são extremamente úteis para avaliar os níveis glicêmicos médios. Em nove dos 19 cães diabéticos sob insulino terapia a hemoglobina glicada e frutossamina foram dosadas mensalmente para monitorar o tratamento de cada paciente com um número diferente de dosagens de cada paciente de acordo com a sobrevivência de cada paciente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hemoglobina glicada, frutossamina, cão, insulino terapia.



## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) occurs due to a pancreas islets' beta cells destruction because of a defect in the insulin secretion or in the insulin receptors. The laboratory diagnosis is based in the measurement of the fasting glucose levels or oral glucose tolerance test. The main signs of DM are: polyuria, polydipsia, polyphagia and glycosuria. After the diagnosis and treatment, DM must be monitored and controlled by measuring periodically the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels. These parameters are widely used in humans with well established reference values and standardized and updated methodology. In this study the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels were determined for 19 diabetics dogs in order to evaluate the results in the DM. The mean values for the hemoglobin glycosylated were 10.3%, 687.0  $\mu\text{mol/L}$  for the fructosamine and 494.2 mg/dL for glucose. These values are considerably higher than those for non diabetic dogs, indicating that these are extremely useful methods for monitoring mean glycemic levels. In nine of the 19 diabetic dogs undergoing insulin therapy the hemoglobin glycosylated and fructosamine levels were monthly measured for monitoring the treatment of each patient, with a different number of measurements for each one, according to the patient's survival.

**KEY WORDS:** hemoglobin glycosylated, fructosamine, dog, insulin therapy.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma das endocrinopatias mais comuns nos cães e pode ser fatal se não for diagnosticada e adequadamente tratada. A deficiência de insulina que ocorre no diabetes mellitus é resultante da incapacidade das ilhotas pancreáticas em secretar insulina e ou da sua ação deficiente nos tecidos (LITTLE et al., 2005).

A maior incidência do DM ocorre entre os sete e 14 anos de idade (GUPTILL et al., 2003). Diversos fatores predispoem ao desenvolvimento da doença, sendo os mais importantes a predisposição genética, pancreatite, obesidade, antagonismos hormonais e infecções (FLEEMAN e RAND, 2001; REUSCH et al., 2002).

Níveis glicêmicos persistentemente elevados são tóxicos ao organismo, podendo evoluir para as complicações do DM mal controlado. O descontrole permanente acarreta uma série de complicações orgânicas, resultando em danos aos tecidos, perda de função e falência de vários órgãos (PIMAZONI, 2003; SUMITA et al., 2006).

O DM é diagnosticado pela detecção do aumento da glicose plasmática em jejum ou pela curva glicêmica e é importante que o diagnóstico do DM seja feito precocemente, pois, desta forma pode-se melhorar a qualidade de vida do animal e também prevenir complicações futuras provenientes do DM (KANEKO et al., 2008).

O DM em cães é classificado em três tipos de acordo com a capacidade secretória das células beta do pâncreas e o tratamento varia de acordo com o tipo de diabetes que o animal venha apresentar, podendo ser necessária a aplicação de insulina diariamente (GOLDESTINE, 2004; BLOOMGARDEN, 2008).

Estudos têm demonstrado que a variação biológica intra-individual da hemoglobina glicada é desprezível. Quanto a variação biológica inter-individual, não ocorrem efeitos clinicamente significativos de idade ou raça. Não são descritas variações circadiana ou nas diferentes estações do ano de hemoglobina glicada (SACKS, et al., 2002; SUMITA E ANDRIOLO, 2008).

O sucesso do tratamento é resultado do diagnóstico bem consolidado e do acompanhamento do paciente. Os parâmetros laboratoriais permitem uma maior segurança no tratamento do animal, assim como ajustes nas doses de insulina, resultando em melhor condição de vida do animal (WATANABE, 2004).

A dosagem da frutossamina e hemoglobina glicada são de extrema importância, por refletir os níveis glicêmicos médios a longo e curto prazo e permite intervenção clínica em tempo útil (SACKS, D. B., 2003; KANEKO et al., 2008).

Atualmente, na medicina, os conhecimentos no diagnóstico, tratamento e controle do diabetes mellitus no Brasil e no mundo encontram-se bem avançados, principalmente no quesito hemoglobina glicada e frutossamina, utilizadas para monitorar o controle da doença. Além disso, também podem prever complicações futuras provenientes do controle inadequado do diabetes mellitus. Hoje, esta realidade pode estar próxima ou presente na medicina veterinária. Porém no Brasil e no mundo, os estudos são escassos com hemoglobina glicada e frutossamina e os valores de referência são de literatura antiga.

Os objetivos deste trabalho foram determinar os valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina e monitorar o tratamento pela dosagem da hemoglobina glicada e frutossamina em cães diabéticos sob insulino terapia.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 19 cães atendidos na rotina da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, Curitiba (UFPR). Os animais selecionados apresentavam sinais clínicos de diabetes. Foram realizadas coletas de sangue por venopunção em tubos com e sem anticoagulante (EDTA). Cães com valores séricos de glicose superior a 110,0 mg/dL (valor de referência) foram selecionados para o estudo. Nas amostras de soro utilizadas para dosagens de glicose foram realizadas as dosagens da frutossamina. As dosagens de hemoglobina glicada foram realizadas nas amostras de sangue total.

Nos cães diabéticos foi realizado tratamento com insulinoterapia, com aplicações iniciais diárias de 0,25 U/Kg, de acordo com protocolo padrão adotado na Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os cães sob insulinoterapia foram monitorados mensalmente com número de coletas que variam de duas a sete individualmente de acordo com sobrevivência dos cães, foram realizados também exame clínico e coletas de sangue para avaliação da glicose, hemoglobina glicada e frutossamina.

### **2.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

A análise da glicose foi realizada pelo método enzimático glicose oxidase no analisador semi-automático CELM SBA 200 (CELM, Barueri, Brasil) com kit comercial (Human do Brasil (Itabira, Brasil)).

A hemoglobina glicada foi determinada pelo método de resina de troca iônica com kit comercial (Human do Brasil) e a frutossamina pelo método cinético por redução do azul de nitrotetrazólio (NBT), com kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). A determinação da porcentagem da hemoglobina glicada e da frutossamina foram feitas por leitura em espectrofotômetro Quick-Lab (Dreake, São José do Rio Preto, Brasil).

### 3. RESULTADOS

Os resultados, média e desvio padrão, da hemoglobina glicada, frutossamina e glicose obtidos dos 19 animais diabéticos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros de glicose, hemoglobina glicada e frutossamina (valores médios e desvio padrão) de cães diabéticos.

<b>Animal</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>GLICOSE (mg/dL)</b>	<b>HB GLICADA (%)</b>	<b>FRUTOSAMINA ( mol/L)</b>	
1	18	700,0	15,1	638,0	Óbito
2	08	170,0	8,8	526,0	Óbito
3	08	631,0	15,0	761,0	Óbito
4	10	702,0	11,0	1260,0	Óbito
5	11	934,0	7,7	895,0	Óbito
6	12	574,0	14,6	792,0	Óbito
7	08	130,0	7,6	510,0	N. R.
8	08	520,0	13,0	887,0	Óbito
9	08	468,0	10,0	754,0	
10	06	402,0	9,5	590,0	Óbito
11	12	445,0	8,1	603,0	Óbito
12	08	465,0	11,1	580,0	N. R.
13	10	480,0	10,0	520,0	N. R.
14	08	550,0	10,0	525,0	N. R.
15	07	489,0	9,5	660,0	
16	14	435,0	8,5	476,0	Óbito
17	10	392,0	8,8	614,0	
18	11	512,0	11,0	718,0	
19	09	390,0	7,2	744,0	N. R.
<b>MÉDIA</b>		<b>494,2</b>	<b>10,3</b>	<b>687,0</b>	
<b>D.P.</b>		<b>180,03</b>	<b>2,48</b>	<b>186,94</b>	

HB: hemoglobina glicada; D.P: desvio padrão; N.R.: não retornou

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios, desvio padrão e intervalos mínimo e máximo, da hemoglobina glicada, glicose e frutossamina dos cães diabéticos.

Tabela 2- Valores médios, desvio padrão e intervalos mínimo e máximo da hemoglobina glicada, frutossamina e glicose em cães diabéticos.

	<b>HB GLICADA</b> (%)	<b>FRUTOSAMINA</b> ( mol/L)	<b>GLICOSE</b> (mg/dL)
<b>MÉDIA ± D.P.</b>	10,30 ± 2,48	680, ± 186,94	494,2±180,03
<b>MIN-MAX</b>	7,82-12,78	511,8-1007,20	314,17-674,23
<b>MÉDIA GERAL</b>	10,3	687,0	494,2

HB:hemoglobina glicada; D.P:desvio padrão; min:mínimo; max:máximo.

Os valores médios e desvio padrão da hemoglobina glicada, glicose e frutossamina dos nove pacientes diabéticos sob insulinoaterapia estão apresentados na Tabela 3, incluídos os parâmetros obtidos no momento do diagnóstico da DM.

Tabela 3- Valores médios e desvio padrão da hemoglobina glicada, glicose e frutossamina dos pacientes diabéticos sob insulino terapia\*.

Animal	Idade anos	GLICOSE (mg/dL)	HB GLICADA (%)	FRUTOSAMINA ( mol/L)	
4	10	702,0	11,0	1260,0	
		560,0	11,0	964,0	Óbito
6	12	574,0	14,6	792,0	
		65,0	8,1	367,0	Óbito
9	8	468,0	10,0	754,0	
		262,0	9,6	816,0	
		216,0	8,7	800,0	
		238,0	8,0	684,0	
		158,0	6,8	364,0	
		106,0	6,6	372,0	
		133,0	6,9	360,0	
10	6	402,0	9,5	590,0	
		105,0	7,4	622,0	
		221,0	7,2	360,0	
		645,0	9,0	910,0	Óbito
11	12	445,0	8,1	603,0	
		430,0	8,0	641,0	
		463,0	9,2	662,0	
		593,0	10,0	700,0	Óbito
15	7	489,0	9,5	660,0	
		85,0	7,5	430,0	
		35,0	5,6	396,0	
		87,0	7,0	361,0	
		162,0	6,6	355,0	
		70,0	6,4	365,0	
		119,0	6,5	350,0	
16	14	435,0	8,5	476,0	
		52,0	7,9	416,0	
		534,0	8,4	544,0	Óbito
17	10	392,0	8,8	614,0	
		261,0	9,6	778,0	
		199,0	9,4	764,0	
18	11	512,0	11,0	718,0	
		100,0	9,0	432,0	
		90,0	8,8	500,0	
<b>MÉDIA</b>		<b>297,4</b>	<b>8,6</b>	<b>593,7</b>	
<b>D.P.</b>		<b>202,59</b>	<b>1,74</b>	<b>215,75</b>	

HB:hemoglobina glicada; D.P:desvio padrão. \* incluídos os parâmetros do diagnóstico da DM.

#### 4. DISCUSSÃO

O *Diabetes mellitus* transformou-se em importante doença na medicina veterinária, sendo frequentemente diagnosticada em cães (FARIA, 2007). É de difícil controle, pois dependendo do tipo de diabetes, requer aplicações diárias de insulina em horários determinados e há necessidade de monitorar o tratamento com ferramentas confiáveis e seguras.

Na medicina, a glicose é utilizada para fornecer o nível glicêmico no momento da coleta. A hemoglobina glicada e frutossamina são ferramentas muito utilizadas porque fornecem informações precisas dos níveis médios glicêmicos a curto e longo prazo, com valores de referência definidos. Somente com a hemoglobina glicada pode-se ter uma média dos níveis glicêmicos do paciente (NATHAN et al., 2008). Na medicina veterinária ainda não existem estas informações, pois os valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina são de literatura antiga, não determinadas com metodologia padronizada.

Em estudo recente (Capítulo II da Dissertação), os valores médios das concentrações sanguíneas da hemoglobina glicada e frutossamina de 100 cães sadios não diabéticos foram de 5,3-7,0% e 277,5-387,3  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. No presente trabalho, a glicose média dos cães foi de 494,2 mg/dL, e os animais apresentavam glicosúria no momento do diagnóstico. Obteve-se valores médios de hemoglobina glicada de 10,3% e frutossamina de 687,0  $\mu\text{mol/L}$ , acima dos valores de referência para animais não diabéticos.

Em estudos anteriores os valores obtidos para hemoglobina glicada, em cães não diabéticos, foi de 2,29% e para cães diabéticos de 6,43% (MAHAFFEY e CORNELLIUS, 1982; KANEKO et al., 2008). Em outro estudo, os valores de hemoglobina glicada foram de 4,97% para cães não diabéticos e 9,63% para cães diabéticos (WOOD e SMITH, 1980; KANEKO et al., 2008). Os resultados dos dois estudos diferem porque foram determinados com metodologias não padronizadas como referência.

Os valores da hemoglobina glicada obtidos neste estudo, pelo método de resina de troca iônica utilizado para humanos, é uma metodologia padronizada mundialmente como método de referência. A metodologia pode ser extrapolada para cães porque as frações de hemoglobina existentes nos eritrócitos dos cães são



idênticas as encontradas nos eritrócitos humanos, inclusive com valores de referência semelhantes (BRIMHAELL, et al., 1997).

A frutossamina é utilizada para avaliar o controle glicêmico recente, uma a duas semanas antecedentes a coleta do sangue. É uma ferramenta muito útil, pois quando os resultados obtidos encontram-se acima dos valores de referência ou aumentados em relação à última determinação, indica-se a revisão do esquema terapêutico. No Brasil não existem trabalhos relatando a determinação de valores de referência para frutossamina para cães não diabéticos. Os valores utilizados são de literatura americana, em que JENSEN e AAES (1992) e ELLIOT et al., (1999), determinaram valores de referência da frutossamina para cães não diabéticos e com metodologia utilizada para humanos. Os autores estabeleceram valores de 279,7-322,3  $\mu\text{mol/L}$  e 225,0-375,0  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente (JENSEN and AAES, 1992; ELLIOT et al., 1999).

Em um estudo recente realizado no Brasil realizou-se a determinação de frutossamina, (capítulo II), foram utilizados 100 cães sadios não diabéticos para determinar os valores de referência. Os resultados obtidos foram de 273,51-382,29  $\mu\text{mol/L}$ . No presente estudo a frutossamina foi determinada em 19 cães diabéticos com a mesma metodologia supracitada para determinar os valores de referência, e o valor médio obtido foi de 687,0  $\mu\text{mol/L}$ . O método utilizado foi o mesmo dos autores anteriores, porém com modificações, como a adição de novas substâncias na composição do reagente com o intuito de obter resultados mais confiáveis, com menos interferência.

Em relação aos valores da glicose, hemoglobina glicada e frutossamina dos animais diabéticos, no momento do diagnóstico e durante o controle do tratamento da doença. De maneira geral, verifica-se que os animais quatro, seis, 10, 11 e 16, apesar do tratamento com insulina, não conseguiram manter os níveis glicêmicos próximos aos níveis normais de referência e todos os animais foram a óbito em até quatro meses após o diagnóstico.

No animal seis, um mês após o diagnóstico do DM, verificou-se resultado normal de glicose (65,0 mg/dL), provavelmente devido aplicação de insulina. A frutossamina também está dentro dos valores de referência, de 367,0  $\mu\text{mol/L}$ , indicando que este animal estava evoluindo para um controle recente do DM. A hemoglobina glicada foi de 8,1%, ainda acima dos valores de referência. A hemoglobina glicada reflete os níveis médios da glicose por aproximadamente 120

dias precedentes a coleta, necessitando de um tempo sob controle da doença para que os níveis retornem aos valores normais de referência para cães, tempo de vida do eritrócito do cão (WANER, et al., 2000). No animal 16, um mês depois de diagnosticado e tratado, verificou-se glicose de 52,0 mg/dL, deve ter sido influenciada pela aplicação da insulina mas a hemoglobina glicada e a frutossamina que não são influenciadas pela aplicação da insulina, estavam acima dos valores indicados para animais diabéticos sob controle, indicando que o animal está com o diabetes fora de controle.

Os animais nove e 15 evoluíram bem com o tratamento, porque quando diagnosticados e tratados tiveram bom desempenho. Os níveis de glicose, hemoglobina glicada e frutossamina diminuíram para valores de referência para cães. O resultado de glicose de 162,0 mg/dL do animal 15, em uma das determinações, está bem acima dos valores de referência, pode ter sido influenciado pelo estresse no momento da coleta, pela ingestão de alimento ou pela aplicação de insulina, mas a hemoglobina glicada e a frutossamina estão dentro dos valores normais de referência, não aumentam em relação aos valores obtidos nas determinações anteriores. Estes resultados indicam que, os animais nove e 15 estão recebendo a dosagem correta de insulina, nos horários corretos (PIROLI et al., 2004).

Os animais 17 e 18 mesmo tratados com insulina, não evoluíram bem. No animal 17 verificou-se diminuição dos níveis de glicose, mas a hemoglobina glicada e frutossamina aumentaram em relação aos níveis obtidos na primeira determinação no momento do diagnóstico da doença, indicando que a aplicação de insulina está sendo feita de maneira incorreta ou a dosagem não está adequada, sendo indicado a avaliação do esquema terapêutico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009 ).

No animal 18 verificou-se que os níveis glicêmicos diminuíram para os valores de referência para cães, mas a hemoglobina glicada e a frutossamina estavam acima dos valores desejáveis nas duas determinações após o diagnóstico, indicando que o esquema terapêutico não está correto, de acordo com os resultados obtidos o proprietário está fazendo o tratamento correto na semana ou nos dias das coletas de sangue, desta forma é possível manter os níveis glicêmicos dentro dos valores normais, mas não é possível a diminuição dos níveis de hemoglobina glicada e frutossamina, indicando que este animal ainda apresenta níveis glicêmicos persistentemente elevados (CHANDALIA e KRISHNASWAMY, 2002).

## **5. CONCLUSÕES**

**5.1** em cães diabéticos (glicose > 110,0 mg/dL) os valores médios de hemoglobina glicada foram de 7,82-12,78% e de frutossamina de 511,8-1007,2  $\mu\text{mol/L}$ ;

**5.2** nos animais diabéticos sob insulino terapia, com bom controle do DM, os valores de hemoglobina glicada e frutossamina diminuíram;

**5.3** nos cães com DM não controlado, a hemoglobina glicada e frutossamina permaneceram elevadas;

**5.4** a hemoglobina glicada e frutossamina não são influenciadas pelo momento da coleta ou pela aplicação da insulina como ocorre com a glicose, fornecendo informações dos níveis médios de glicose a curto e longo prazo;

**5.5** as dosagens periódicas de hemoglobina glicada e frutossamina são extremamente úteis para avaliar o controle do tratamento do DM.

## 6. REFERÊNCIA

- Atualização brasileira sobre diabetes. *SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES*. Versão atualizada 2009. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/atualizacaodiabetes2009.pdf>>. Acesso em 10 de janeiro de 2011.
- BRIMHAELL, B., DUERST, M. & JONES, R. T. 1997. The amino acid sequence of dog (*Canis familiaris*) haemoglobin. **Journal of Molecular Evolution** 9, 231-235.
- BLOOMGARDEN, Z. T.; INZUCCHI, S. E.; KARNIELI, E.; Le ROITH, D. The proposed terminology "A1C derived average glucose" is inherently imprecise and should not be adopted. **Diabetologia**, 2008; 51: 1111-1114.
- CHANDALIA, H. B.; KRISHNASWAMY, P. R. Glycated hemoglobin. **Current Science**, v. 12, n. 83, p. 1522-32, 2002.
- ELLIOT DA, NELSON RW, REUCH CE, et al: Comparison or serum fructosamine and blood glycosylated hemoglobin concentrations for assessment of glicemic control in cats and dogs with diabetes mellitus. **JAVMA** 214 (12): 1794-1798, 1999.
- FAIRA, P. F. Diabetes mellitus em cães. *Acta Veterinária Brasília*. v1, n1, p 8-22. 2007.
- FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S. 2001 Management or canine diabetes. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice*. 31: 855-879.
- GOLDSTEIN, D. E. Tests or glycemia in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1761-73, 2004.
- GUPTILL, L; GLICKMAN, L. & GLICKMAN, N. 2003. Time trenda and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical dara base records. **The Veterinary journal**, 165:240-247.
- GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA. Disponível em:<[HTTP://sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php.id=5&tp=3](http://sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php.id=5&tp=3)>. Acesso em 15 de janeiro de 2011.
- JENSEN A.L., AAES H. 1992. Reference interval and critical diference for canine serum fructosamine concentration. **Veterinary Research Communications**, 16, 317-325.
- KANEKO, J. J., 2008 Carbohydrate metabolism and its disease. In: KANEKO J.J., HARVEY J. W. & BRUSS M. L. eds. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. San Diego: p. 62-70.
- LITTLE, R. R.; ROHLFING, C. L.; WIEDMEYER, H. The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 1985-92, 2005.

MAHAFFEY, E.A.; CORNELIUS, L.M. Glycosylated hemoglobin in diabetic and nondiabetic dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n.6, 1982.

NATHAN, D. M.; KUENEN, J.; BORG, R.; ZHENG, H.; SCHOENFELD, D.; HEINE, R. J. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. **Diabetes Care** 2008; 31:1473-1478.

PIMZZONI NETO, A. A. Importância clínica da hemoglobina glicada (A1c) para avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos. São Paulo, **Aventis Pharma**, 2003.

PIROLI, G. G.; GRILLO, C. A.; CHARRON, M. J.; Mc EWEN, B. S.; REAGAN, L. P.; 2004. Biphasic effects of stress upon glucose transporter expression and trafficking in the diabetic rat hippocampus. **Brain Res**. 1006, 28-35.

REUSCH, C. E.; GERBERT, B.; BORETTI, F. S. 2002. Serum fructosamine concentrations in dogs with hypothyroidism. **Veterinary Research Commun**, 26: 531-536.

SACKS, D. B. Hemoglobin variants and hemoglobin (A1c) analysis: Problem solved. **Clinical Chemistry**, 2003. 49:1245-1247.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. **Jornada Brasileira de Patologia Médica Laboratorial**, 2008. 44:167-174.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus. **Jornada Brasileira de Patologia Médica Laboratorial**, 2006. 42, editorial.

SACKS, D. B.; BRUNS, D. B.; GOLDSTEIN D. E.; MACLAREN, N. K.; McDONALD, J. M.; PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**, 2002;48:436-472.

WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of Inflammatory Disease. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wikins, 2000, p. 205-209.

WATANABE, D.; NAKARA, H.; AKAGI, K.; ISHII, T.; MIZUGUCHI, H.; NAGASHIMA, Y.; OKANIWA, A. 2004. Oral glucose tolerance test and determination of serum fructosamine level in beagle dogs. **Journal Toxicol Sci**, 29:33-36.

WOOD, P. A.; SMITH, J. E. 1980. Elevation rate of glycosylated hemoglobins in dogs after induction of experimental diabetes mellitus. **Metabolism**, 31, 906-909.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços tecnológicos na medicina têm crescido significativamente no mundo todo e conseqüentemente, é uma realidade brasileira. Isso ocorre também na medicina veterinária, sendo cada vez mais frequente e necessário a utilização de exames laboratoriais no auxílio ao diagnóstico, como ferramentas para monitorar o controle e o tratamento das doenças.

Como ocorre em seres humanos, os animais também são acometidos por inúmeras doenças, dentre elas o *Diabetes mellitus*. A doença acomete principalmente os animais de companhia e vem sendo diagnosticada com uma frequência cada vez maior na clínica de pequenos animais. Quando não diagnosticada e tratada corretamente, podem ocorrer complicações graves e morte em curto prazo.

Em seres humanos a hemoglobina glicada e frutossamina são exames utilizados para monitorar o tratamento do *Diabetes mellitus*, sendo que a hemoglobina glicada já é utilizada também para diagnosticar a doença. Na medicina veterinária ainda não são utilizadas rotineiramente, devido a falta de valores de referência e metodologias padronizadas para a sua determinação.

As ferramentas supracitadas são pouco conhecidas e pouco utilizadas na medicina veterinária, sendo de suma importância expandir o conhecimento e as informações sobre estas importantes ferramentas entre os clínicos veterinários em conjunto com os profissionais de análises clínicas veterinárias.

O presente estudo é importante para a atualização sobre a doença na população canina mundial e os valores de hemoglobina glicada e frutossamina na população canina de Curitiba, uma vez que existem poucas informações sobre estes dados principalmente no Brasil.

Este tema é relevante e sugere-se que sejam realizados trabalhos para monitorar pacientes portadores de *Diabetes mellitus* com determinação dos parâmetros de hemoglobina glicada e frutossamina.

Além disso, a perspectiva de novos estudos onde a hemoglobina glicada também possa ser utilizada para diagnosticar o *Diabetes mellitus* em cães como é em seres humanos.

**ANEXO**

**Universidade Federal do Paraná**  
**Setor de Ciências Agrárias**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo no. 048/2010, referente ao projeto “Determinação da hemoglobina glicada e frutossamina de cães saudáveis e diabéticos”, sob a responsabilidade de Olair Carlos Beltrame, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 13 de Setembro de 2010. Este certificado expira em 13 de agosto de 2011.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol number 048/2010, regarding the project “Measurement of glycated hemoglobin and fructosamine in healthy and diabetic dogs”, in charge of Olair Carlos Beltrame, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on September 2010. This certificate expires on September, 2011.

Curitiba, 13 de Setembro de 2010.

A stylized, handwritten signature in blue ink, consisting of a long horizontal stroke with a large loop at the end.

Geraldo Camilo Alberton  
Presidente

A handwritten signature in blue ink, featuring a large 'P' and 'S' with a checkmark-like flourish at the end.

Patrick Schmidt  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.